

Funktionsanalyse des Waisenrezeptors Nur77 im braunen Fettgewebe

DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Timo Kanzleiter
aus
Bad Soden/Ts

Marburg/Lahn (2005)

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
_____ angenommen.

Erstgutachter _____

Zweitgutachter _____

Tag der mündlichen Prüfung am _____

I

1	Einleitung	1
1.1	BAT-WAT	1
1.2	Thermogenese im BAT	1
1.3	Differenzierung von Adipozyten	2
1.3.1	Differenzierung brauner Adipozyten	3
1.4	Nur77 (nuclear receptor 77)	5
1.4.1	Ziele der Arbeit und Funktionshypothesen für Nur77 im BAT	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Zellkultur HIB1B	9
2.1.1	Kultivierung	9
2.2	Zellkultur 3T3L1.....	10
2.3	Transfektionsmethoden.....	11
2.3.1	Nucleofection	11
2.3.2	Auswertung der Transfektionseffizienzen	12
2.4	Dual Luciferase-Reportergenassays	12
2.4.1	Transfektion der Reportgenkonstrukte	12
2.4.2	Induktion von Nur77 und Messung der Luciferase Aktivität	12
2.5	Caspase 9 Assays.....	13
2.6	Stimulation mit Fettsäuren.....	14
2.6.1	Vorbereiten der Fettsäurelösung.....	14
2.7	Klonierung von Nor1 und Nurr1 Sonden	15
2.8	RNA Isolation	15
2.8.1	RNA Isolation aus Zellkultur	15
2.8.2	RNA-Isolation aus Gewebe	16
2.9	Northernblot-Analyse.....	17
2.9.1	Gelelektrophorese.....	17
2.9.2	Kapillartransfer auf Nylonmembranen.....	17
2.9.3	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	17
2.9.4	Hybridisierung	18
2.9.5	Phosphorscreen und Analyse	18
2.10	Isolation von Kernproteinen	19
2.11	Herstellung von Nur77, NOR1 Antikörpern.....	19
2.11.1	Auswahl der Immunisierungspeptide	20
2.11.2	Immunisierung der Kaninchen	20

II

2.11.3	Herstellung der Gelmatrix	20
2.11.4	Aufreinigung der Antikörper	21
2.12	Western Blot Analyse	22
2.12.1	Probenvorbereitung	22
2.12.2	Elektrophoretische Auftrennung	23
2.12.3	Western-Blot.....	23
2.12.4	Immunologische Detektion mit Chemolumineszenz	24
2.13	Genotypisierung von Nur77 Knockout Mäusen	25
2.13.1	DNA-Isolation aus Gewebe	25
2.13.2	PCR-Reaktion.....	26
2.14	Chromatin Immunopräzipitation (ChIP).....	26
2.14.1	Fixieren der Zellen	27
2.14.2	Fragmentierung der DNA.....	27
2.14.3	Immunopräzipitation	27
2.14.4	Aufhebung der Quervernetzung und PCR Analyse	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Induktion von Nur77 durch Fettsäuren	30
3.2	Expression von Nur77 während der Differenzierung von braunen Adipozyten in Kultur	31
3.2.1	Nur77 mRNA Expression während der Differenzierung brauner Adipozyten (HIB1B)	31
3.2.2	Nur77-mRNA-Expression während der Differenzierung weißer Adipozyten (3T3L1)	33
3.3	Regulatorischer Effekt von Nur77 auf den UCP1-Enhancer in HEK Zellen	34
3.4	Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer in HIB1B-Zellen	35
3.4.1	ChIP Analyse ausdifferenzierter HIB1B-Zellen.....	36
3.4.2	ChIP-Analyse nicht differenzierter HIB1B-Zellen.....	37
3.5	Transfektion von HIB1B-Zellen	38
3.5.1	Optimierung der Nucleofektionsbedingungen	38
3.5.2	Quantifizierung der Transfektionseffizienzen	40
3.6	Aktivierung des NBRE und NurRE in HIB1B Zellen nach β -adrenerger Stimulation	41
3.6.1	Aktivität von NBRE und NurRE bei Überexpression von Nur77 in HIB1B-Zellen	42

III

3.6.2	Aktivität von NBRE und NurRE nach β -adrenerger Stimulation in HIB1B-Zellen	42
3.7	UCP1 Expression in Nur77 transfizierten HIB1B-Zellen	44
3.8	Einfluss von Nur77 auf Caspase 9-induzierte Apoptose in HIB1B-Zellen ..	45
3.9	Induktion von NOR1 und Nurr1 in Nur77-Knockout Mäusen	47
3.9.1	Genotypisierung von Nur77 Knockout Mäusen	47
3.9.2	Detektion von NOR1 und Nurr1 im braunen Fettgewebe	48
3.10	Vergleich verschiedener Nur77 Antikörper	50
4	Diskussion	53
4.1	Mechanismen der Nur77 Induktion im braunen Fettgewebe	54
4.1.1	Beta-adrenerge und Oleat vermittelte Induktion von Nur77	54
4.2	Nur77 während der Differenzierung von Adipozyten	56
4.3	Aktivierung der <i>response elements</i> in HIB1B	58
4.4	Regulatorischer Effekt von Nur77 auf das UCP1-Gen	60
4.4.1	Reporterassays mit dem UCP1-Enhancer	60
4.4.2	Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer	61
4.4.3	Einfluss der Nur77 Überexpression auf UCP1 in HIB1B-Zellen	62
4.5	Einfluss von Nur77 auf die Apoptoserate in braunen Adipozyten	64
4.6	Expression von Nurr1 und Nor1 im BAT von Nur77-KO Mäusen	65
4.7	Funktionshypothese von Nur77 im braunen Fettgewebe	66
4.7.1	Einfluss auf die UCP1-Genregulation	67
5	Zusammenfassung	71
6	Literatur	76

Abkürzungen

ADD1	<i>Adipocyte determination- and differentiation dependent factor 1</i>
AF-domain	<i>Activation function domain</i>
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BAT	Braunes Fettgewebe (<i>brown adipose tissue</i>)
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
cAMP	Cyclo-Adenosin-Monophosphat
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FFA	Freie Fettsäuren (<i>free fatty acids</i>)
HEK293	Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen
HIB1B	Zelllinie brauner Adipozyten (<i>hibernoma 1 B</i>)
HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSL	Hormone-sensitive Lipase
IEG	<i>Immediate early gene</i>
ISO	Isoproterenol
KLH	<i>Keyhole limpet haemocyanin</i>
KRBB	<i>Krebs-Ringer-Bicarbonat-Buffer</i>
LAR2	Luciferase Assay Reagenz 2
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
MoMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>

NBRE	<i>NGFIB binding response element</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGFIB	<i>Nerve growth factor induced gene B</i> (Synonym für Nur77)
Nr4a	<i>Nuclear receptor subfamily 4 a</i>
NST	Zitterfreie Wärmebildung (<i>non shivering thermogenesis</i>)
Nur77	Nuclear receptor 77
NurRE	<i>Nuclear receptor response element</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC12	Zelllinie aus Pheochromocytoma-Tumor
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGC1	<i>PPAR gamma coactivator 1</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferators-activated receptor gamma</i>
RARE	<i>Retinoic acid response element</i>
RDA	<i>Representational difference analysis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RXR α	<i>Retinoic-x-receptor</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamid Gelelektrophorese
SRC-2	<i>Steroid coactivator 2</i>
SV40	Simian Virus 40
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
UV	Ultraviolett
WAT	Weißes Fettgewebe (<i>white adipose tissue</i>)

1 Einleitung

1.1 BAT-WAT

Man unterscheidet bei Säugetieren zwei Typen von Fettgewebe, braunes (*brown adipose tissue, BAT*) und weißes Fettgewebe (*white adipose tissue, WAT*). Während das WAT der Speicherung von Energie in Form von Lipiden dient, wird im BAT Energie bei der zitterfreien Wärmebildung (*NST = non shivering thermogenesis*) verbraucht.

BAT und WAT unterscheiden sich außerdem deutlich in ihrer Morphologie. Im WAT sind die Lipide in einem großen zusammenhängenden Bereich (*uniloculär*) eingelagert, während sie im BAT auf mehrere Orte (*multiloculär*) verteilt sind (Abbildung 2).

Die Anzahl der Mitochondrien im BAT ist deutlich größer als im WAT (Abbildung 2). Da die Mitochondrien im BAT über eine sehr große Cristae-Oberfläche verfügen, enthalten sie mehr Cytochrom-C, das dem BAT seine braune Farbe verleiht. Die Innervation und Vaskularisierung des BAT ist stark ausgeprägt, während das WAT nur spärlich von Blutgefäßen durchzogen ist und sich die Innervierung weitestgehend auf die Blutgefäße beschränkt.

1.2 Thermogenese im BAT

Eine besondere Eigenschaft des BAT ist die Expression des Proteins UCP1 (*uncoupling protein 1*) (Ricquier et al. 1991). Das Protein UCP1 ist essentiell für die NST. In den Mitochondrien baut sich durch die Atmungskette ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran auf. Der Rückfluß der Protonen (*proton motive force*) wird normalerweise von der ATP-Synthase genutzt, um ATP zu synthetisieren. UCP1 ist in der inneren Mitochondrialmembran lokalisiert und ist in der Lage, den Rückstrom der Protonen zu nutzen um Wärmeenergie freizusetzen. Da der Fluss der Protonen nun hauptsächlich durch UCP1 erfolgt, spricht man von einer Entkopplung von der ATP-Synthese. UCP1 setzt die Energie der *proton motive force* in Form von Wärme frei. Dies ermöglicht vor allem kleineren Säugetieren ihre Körpertemperatur auch gegen extreme Außentemperaturen durch NST zu verteidigen.

Die Expression von UCP1 findet bei Säugetieren nur im BAT statt und wird dort β -adrenerg kontrolliert. In allen anderen Zelltypen wird die Expression von UCP1 unterdrückt. Einige Transkriptionsfaktoren, die an der UCP1-Genexpression beteiligt sind, wie z.B. PGC-1, RXR α und PPAR γ -sind bereits identifiziert worden (Lowell et al. 2000).

Um andere NST-relevante Gene zu finden, wurden mit einer RDA (*representational difference analysis*) die mRNA-Populationen von β -adrenerg-stimulierten mit nicht stimulierten braunen Fettzellen (HIB1B-Zelllinie) verglichen.

Die RDA kombiniert die subtraktive Hybridisierung zweier mRNA Populationen mit einer anschließenden exklusiven PCR-Anreicherung der Differenzprodukte. Die Subtraktion wurde mit bereits angereicherten Differenzprodukten wiederholt.

Eines der dadurch erhaltenen β -adrenerg-kontrollierten Differenzprodukte war ein cDNA-Fragment des Transkriptionsfaktors Nur77. *In vivo*-Studien an Mäusen zeigten, dass Nur77 mRNA im BAT nach einem Kältestimulus schnell hochreguliert wird (Kanzleiter et al. in Vorbereitung). Im WAT ist Nur77 auch nach einem β -adrenergen Stimulus nicht nachzuweisen.

1.3 Differenzierung von Adipozyten

Die Differenzierung von Adipozyten beinhaltet die koordinierte transkriptionelle Aktivierung einer Vielzahl von adipozytenspezifischen Genen. Diese kodieren sowohl für Enzyme der Lipidsynthese und -speicherung als auch für sekretorische Proteine und Mitglieder von drei Transkriptionsfaktorfamilien (Übersicht in Rosen et al. 2000).

Die Differenzierung von Adipozyten wird durch eine transkriptionelle Kaskade eingeleitet, in der zuerst Transkriptionsfaktoren aus der Familie der *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP) exprimiert werden (Abbildung 1). C/EBP β und δ induzieren die Expression des *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ). Dieser wiederum aktiviert C/EBP α , das in einer Rückkopplungsschleife die Expression von PPAR γ aufrecht erhält. Der *adipocyte determination- and differentiation dependent factor 1* (ADD1, auch SREBP1 genannt) kann PPAR γ aktivieren, indem er entweder die PPAR γ -Expression direkt induziert oder die Produktion eines PPAR γ -Liganden bewirkt.

PPAR γ spielt eine zentrale Rolle bei der Differenzierung von Adipozyten, da die Expression von PPAR γ alleine ausreicht, um Präadipozyten und nicht determinierte Fibroblasten zu Fettzellen ausdifferenzieren zu lassen (Rosen et al. 2002).

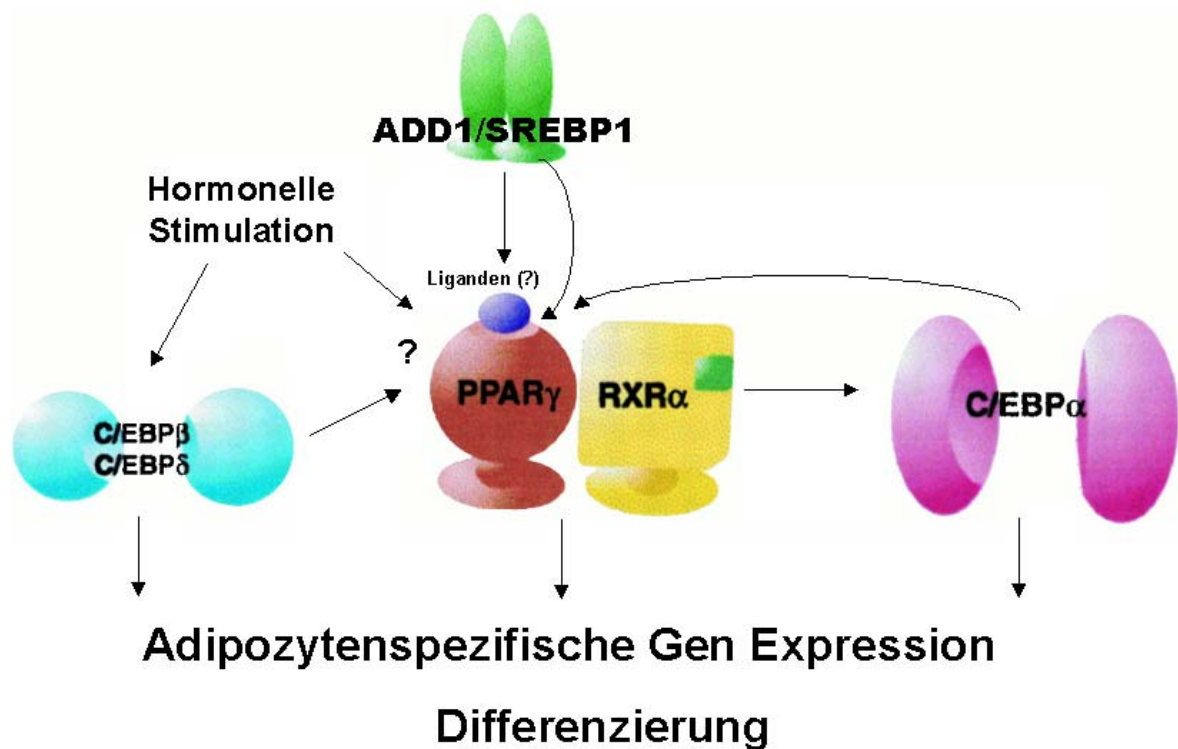


Abbildung 1: Modell der transkriptionellen Kontrolle der Adipozytendifferenzierung. Die Expression von C/EBPβ und δ gehört zu den ersten Ereignissen. Diese Faktoren bewirken die Induktion von PPAR_γ, welches wiederum als Heterodimer mit RXRα, C/EBPα induziert. Durch eine Rückkopplungsschleife hält dieses die PPAR_γ-Expression aufrecht. ADD1 kann sowohl die Expression von PPAR_γ als auch die eines PPAR_γ-Liganden induzieren. Alle diese Faktoren tragen außerdem zur Induktion adipozytenspezifischer Gene bei. (verändert nach Rosen & Spiegelman 2000)

1.3.1 Differenzierung brauner Adipozyten

Die bei der Differenzierung beteiligten Faktoren werden sowohl im WAT als auch im BAT exprimiert. Daher war die Entdeckung des im BAT -aber nicht im WAT-exprimierten PPAR_γ Koaktivators PGC-1 (*PPAR gamma Coactivator 1*; (Puigserver et al. 1998) ein wichtiger Schritt im Verständnis der molekularen Grundlagen, die zur Entstehung von weißen oder braunen Adipozyten führen.

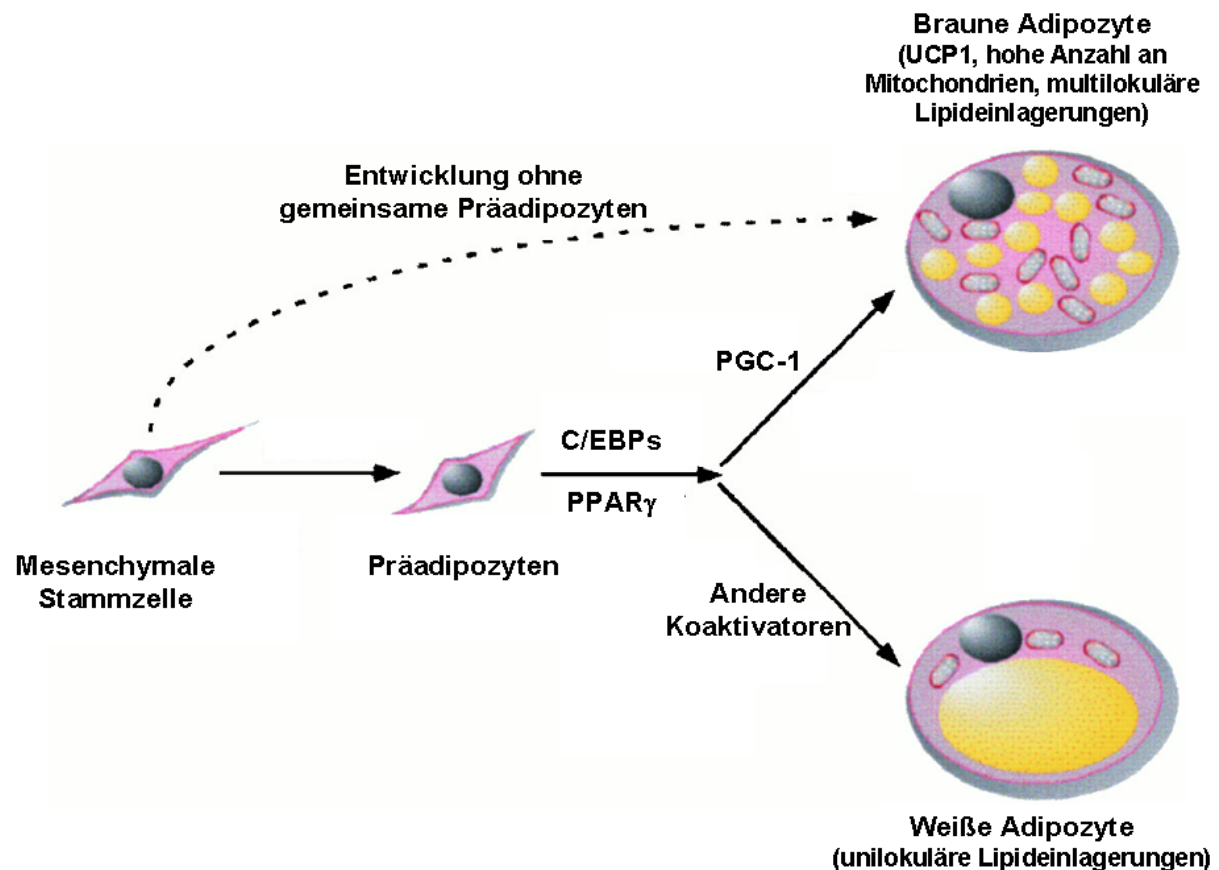


Abbildung 2: Entwicklung brauner und weißer Adipozyten (verändert nach Rosen & Spiegelman 2000)

Einige Hinweise sprechen dafür, dass PGC-1 an der Entwicklung brauner Adipozyten aus Präadipozyten beteiligt ist: Erstens bindet und aktiviert PGC-1 PPAR γ , einen Faktor, der den UCP1-Enhancer aktivieren kann, und führt damit zu gesteigerter UCP1 Expression (Puigserver et al. 1999; Wu et al. 1999). Zweitens führt Überexpression von PGC-1 in weißen Fettzellen zu einer Induktion der UCP1-Expression und gesteigerter mitochondrialer Biogenese (Tiraby et al. 2003), beides BAT spezifische Charakteristika. Drittens wird die PGC-1-Expression durch die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren und Erhöhung intrazellulärer cAMP Mengen gesteuert. Beides Wege, die im BAT zu erhöhter UCP1-Expression und Hypertrophie führen (Puigserver et al. 1998).

Es bleibt allerdings ungeklärt, ob BAT und WAT aus den gleichen Präadipozyten entstehen oder auf unterschiedlichen Wegen aus undeterminierten mesenchymalen Stammzellen entstehen (Abbildung 2). Erste Hinweise in Experimenten mit Primärkulturen aus WAT und BAT, bei denen die Genexpression von Präadipozyten verglichen wurde, führten zur Identifikation einiger differentiell exprimierter Gene

(Boeuf et al. 2001). Dies lässt vermuten das Präadipozyten bereits determiniert sind und zwei unterschiedliche Arten von Adipozytenvorläuferzellen existieren.

1.4 Nur77 (nuclear receptor 77)

Nur77 wurde ursprünglich in der Zelllinie PC12 (*rat pheochromocytoma cells*) entdeckt als ein Gen, das durch NGF (*nerve growth factor*) induziert wird. (*NGFI-B = nerve growth factor induced gene*)(Milbrandt. 1988). Interessanterweise spielt dieses durch einen Faktor für Differenzierung und Wachstum induzierte Protein auch eine bedeutende Rolle in der Apoptose, dem programmierten Zelltod (Woronicz et al. 1994).

Nur77 ist unter vielen Namen bekannt: In der Ratte als NGFI-B, im Menschen als TR3, NAK1 und ST59 und in der Maus als Nur77, N10 und TIS1. Es handelt sich um einen Kernrezeptor der Thyroid/Steroid Familie und bildet zusammen mit Nurr1 und Nor-1 eine Unterfamilie der Kernrezeptoren (Nr4a-Unterfamilie) (Maruyama et al. 1998). Da noch keine spezifischen Liganden für die Mitglieder der Nr4a-Familie gefunden wurden, bezeichnet man sie auch als Waisenrezeptoren (*orphan receptors*).

Nur77 gehört zur Gruppe der *immediate early genes* (IEG) und wird durch eine Vielzahl von Stimuli z.B. von Wachstumsfaktoren reguliert (Fahrner et al. 1990; Maruyama et al. 1998). Die Transkription der IEGs geschieht innerhalb weniger Minuten und stellt eine schnelle Antwort der Zelle auf verschiedene Einflüsse dar. Die IEGs werden schnell und transient transkribiert, sind jedoch nur kurze Zeit in der Zelle nachweisbar. Die Halbwertszeit der Nur77-mRNA beträgt beispielsweise nur etwa 20 Minuten (Fahrner et al. 1990).

Das Protein Nur77 besteht aus einer zentralen DNA-bindenden Domäne (*DBD = DNA binding domain*), die zwei Zinkfinger enthält, einer C-terminalen Region, die hohe strukturelle Ähnlichkeiten mit Liganden-bindenden Domänen (*LBD = ligand binding domain*) anderer Kernrezeptoren aufweist und einer N-terminalen Domäne (Abbildung 3).

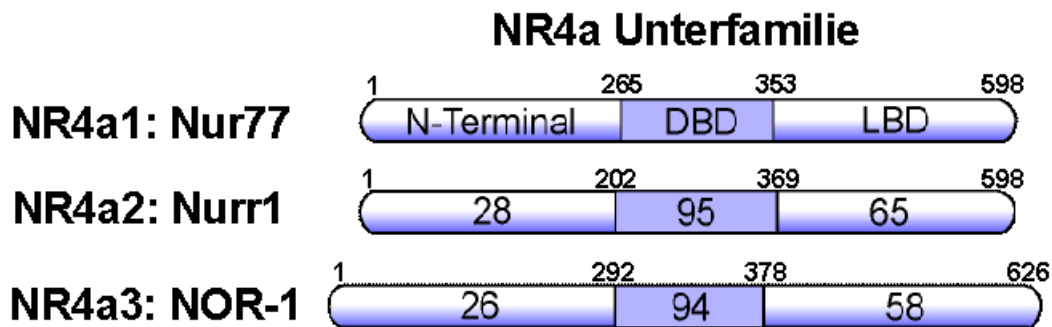


Abbildung 3: Funktionelle Domänen der Nr4a Kernrezeptoren, (In Zahlen die prozentuale Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der jeweiligen Domäne; DBD: DNA-bindende Domäne, LBD: Ligand-bindende Domäne, verändert nach Maruyama et al 1998)

Nur77 besitzt, wie für Kernrezeptoren charakteristisch, zwei transaktivierende Bereiche, die sogenannten *activation function domains* (AF). Der erste Bereich (AF1) befindet sich in der N-terminalen Domäne zwischen den Aminosäuren 50-160 (Wansa et al. 2002) und die AF2 ist in der C-terminalen LBD an Position 585-599 lokalisiert. Die normalerweise für die Bindung von Koaktivatoren wichtige AF2-Domäne in der LBD scheint bei Nur77 nicht diese Funktion auszuüben. Es konnte jedoch eine direkte Interaktion zwischen AF1 und dem *Steroid Coactivator 2* (SRC-2) nachgewiesen werden, welche die Transaktivierung durch Nur77 reguliert (Wansa et al. 2002). Das Vorliegen als Monomer, Homo- oder Heterodimer, sowie die Phosphorylierung von Nur77 bestimmt die Funktion und den Wirkungsort in der Zelle.

Das Molekulargewicht des neu synthetisierten Proteins beträgt etwa 61kDa und kann durch unterschiedliche Zustände der Phosphorylierung 61-88kDa betragen (Fahrner et al. 1990). Dies hat je nach Ort der Phosphorylierung unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktionalität und die intrazelluläre Lokalisierung von Nur77. Durch Phosphorylierung des Serin-Restes an Position 316 in der DBD wird die transkriptionelle Aktivität von Nur77 unterbunden. Phosphorylierung eines anderen Serin-Restes (Ser105) führt in PC12-Zellen zu einem Kernexport von Nur77 (Katagiri et al. 2000).

Als Monomer bindet es an eine oktamere Sequenz, das NBRE (*NGFI-B response element*) (Wilson et al. 1991). Es kann auch als Homodimer oder Heterodimer mit den beiden anderen Mitgliedern der Nr4a-Familie aktiv werden und bindet dann an NurRE (*Nur77 response element*) (Philips et al. 1997). Als Heterodimer mit RXR (*retinoid X receptor*) ist es in der Lage eine Reihe von Retinonsäure *response elements* (RARE) zu aktivieren (Perlmann et al. 1995).

1.4.1 Ziele der Arbeit und Funktionshypothesen für Nur77 im BAT

Beta-adrenerge Stimulation von braunen Adipozyten führt sowohl zu akuten Effekten wie der Aktivierung von UCP1, als auch zu chronischen Effekten wie die Induktion der UCP1-Expression, Hypertrophie und Differenzierung von braunen Adipozyten. Da Nur77-Expression im BAT ebenfalls β -adrenerg kontrolliert wird, ist eine Beteiligung von Nur77 an einem oder mehreren dieser Prozesse wahrscheinlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mögliche Funktionen von Nur77 in braunen Adipozyten untersucht werden. Basierend auf Arbeiten über Nur77 in anderen Zellsystemen oder Geweben sind mehrere Funktionshypothesen von Nur77 in braunen Adipozyten denkbar:

1) Expression von UCP1 wird u.a. durch einen Heterodimer aus $\text{PPAR}\gamma$ und $\text{RXR}\alpha$ induziert. Nur77 kann mit $\text{RXR}\alpha$ Heterodimere bilden und könnte mit $\text{PPAR}\gamma$ um den Heterodimerisierungspartner konkurrieren. Experimente in PC12-Zellen zeigten einen durch NGF induzierten Kernexport des Nur77/ $\text{RXR}\alpha$ Heterodimers (Katagiri et al. 2000). Da im BAT sowohl NGF-Rezeptoren exprimiert werden als auch NGF nach β -adrenerger Stimulation sezerniert wird, könnte auf diesem Wege die im Kern verfügbare Menge an $\text{RXR}\alpha$ vermindert werden. In einer früheren Arbeit konnte die NGF induzierte Translokation von Nur77 auch in braunen Adipozyten gezeigt werden (Diplomarbeit Timo Kanzleiter, 2001). Daher könnte Nur77 zu einer Hemmung der UCP1-Expression führen.

2) In Experimenten mit Zellen aus Schilddrüsengewebe konnte eine Induktion von Nur77 während der Proliferation und Differenzierung gezeigt werden. Nur77 scheint in der Schilddrüse zu einem späten Zeitpunkt der Differenzierung die Expression verschiedener Gene zu induzieren, die nur in ausdifferenzierten Zellen vorkommen (Jimenez-Cervantes et al. 1998). Daher wäre es denkbar, dass Nur77 auch während der Differenzierung brauner Adipozyten eine Rolle spielt.

3) Am besten charakterisiert ist die Funktion von Nur77 während der Apoptose in T-Zellen. Expression von Nur77 führt in T-Zellen zur Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom C und die dadurch induzierte Aktivierung von Caspase 9 (Woronicz et al. 1994). Interessanterweise führt β -adrenerge Stimulation im BAT zur Absenkung der Apoptoserate (Lindquist et al. 1998) aber gleichzeitig auch zur Induktion von Nur77. Dieser zunächst paradoxe Befund kann jedoch damit erklärt werden, dass Apoptose im BAT u.a. durch Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) induziert wird (Nisoli et al. 2000)

und TNF- α vermittelte Apoptose durch Nur77 blockiert werden kann (Suzuki et al. 2003). Nur77 könnte also als antiapoptotischer Faktor im BAT agieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur HIB1B

HIB1B-Zellen sind eine von braunen Adipozyten abgeleitete Zelllinie. Die zur Etablierung dieser Zelllinie benötigten Zellen wurden aus Tumoren des braunen Fettgewebe (hibernoma) von SV40 transfizierten Mäusen isoliert. Mit Hilfe des Simian Virus 40 (SV40) kann man gewebespezifische Tumore induzieren, sobald er unter die Kontrolle eines entsprechenden Promotors gestellt wird. In diesem Fall war das SV40-Konstrukt an den Promotor des adipozytenspezifischen Gens aP2 gekoppelt. Die transgenen Mäuse entwickelten Tumore im braunen Fettgewebe aus denen die HIB1B-Zelllinie etabliert werden konnte (Ross et al. 1992).

Die Expression des BAT-spezifischen Entkopplerproteines UCP-1 ist nur nach β -adrenerger Stimulation in den HIB1B-Zellen nachweisbar. Die Fähigkeit zur UCP-1 Induktion ist auch nach dreißig Generation noch vorhanden (Klaus et al. 1994).

2.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung der HIB1B-Zellen wurde modifiziert nach Klaus (Klaus et al. 1994) in 10 cm Kulturschalen (GREINER) mit 7 ml DMEM/F-12 Medium s.u. (GIBCO) durchgeführt. Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (FORMA SCIENTIFIC) bei 37°C und 5% CO₂.

Dem Medium wurde unmittelbar vor dem Gebrauch 50 µg/ml des Antibiotikums Gentamycin (GIBCO) und 2,5 µg/ml des Antimykotikums Amphotericin B (SIGMA) zugesetzt. In der Proliferationsphase der Zellen (bis zur Konfluenz) betrug der Gehalt an fötalem Kälberserum (FCS; BIOCHROM) im Medium 10%.

Zum Passagieren der Zellen wurden sie zuerst kurz mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsinpuffer von der Platte abgelöst. Durch Zugabe von 7 ml Medium (10% FCS) wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen je nach Dichte auf 4-8 Platten aufgeteilt.

Sobald die Zellen ein konfluentes Stadium erreichten, wurde die Differenzierungsphase mit der Zugabe von 17 nM Insulin eingeleitet und der Gehalt an FCS auf 7% abgesenkt (siehe Abbildung 4). Nach etwa neun Tagen waren die Zellen zu braunen Adipozyten ausdifferenziert.

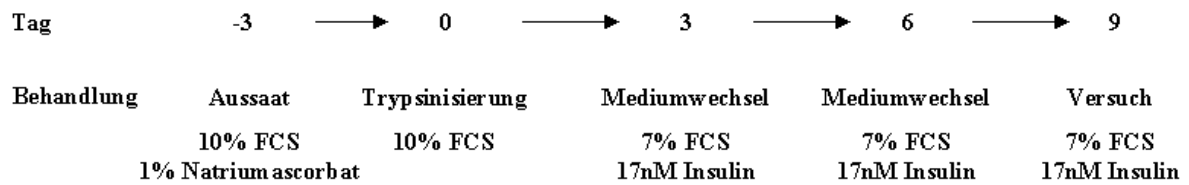


Abbildung 4: Zeitplan zur Kultivierung von HIB1B Zellen

Material:

Medium:

DMEM/F12 (1:1), 14mM Natriumhydrogencarbonat, 0,016 mM Biotin, 0,018mM Calciumpanthetonat, 5 mM Glutamin, 15 mM Glucose und 15 mM HEPES (pH7,4)

Trypsinpuffer:

0,2% Trypsin, 50µM EDTA, 10µM Natriumascorbat in PBS pH 7,4

PBS:

100 mM NaCl, 80 mM Na₂HPO₄, 20 mMNaH₂PO₄ x H₂O, pH 7,4

2.2 Zellkultur 3T3L1

Diese Zelllinie aus Fibroblasten kann in Kultur zu weißen Adipozyten differenziert werden (Green et al. 1974). In der Proliferationsphase erhielten die Zellen DMEM Medium mit 10% *Bovine calf serum* (Hitze inaktiviert; SIGMA). Kultivierung mit FCS führt in dieser Phase zu einer Transformation der Zellen und verhindert später eine vollständige Ausdifferenzierung.

Sobald die Zellen ein Stadium der Konfluenz erreicht haben, wurden sie zwei Tage in Induktionsmedium kultiviert. Dies führte zu einer leichten Abrundung der Zellen. Durch Kultivierung mit Differenzierungsmedium für 5-8 Tage differenzierten die Zellen zu weißen Adipozyten.

Material:

Proliferationsmedium:

DMEM, 10% BCS

Induktionsmedium:

DMEM, 10% FCS, 0,5 mM methylisobutylxanthine, 1 µM Dexamethasone, 5 µg/ml Insulin

Differenzierungsmedium:

DMEM, 10% FCS, 5 µg/ml Insulin

2.3 Transfektionsmethoden

Zur Transfektion von HIB1B-Zellen wurde mehrere Methoden getestet. Calcium-Phosphat und Liposomen basierende Methoden erzielten trotz gegenteiliger Berichte aus der Literatur (Altioek et al. 1997; Lin et al. 2002) nur geringe Transfektionseffizienzen. Daher wurde ein retrovirales System eingesetzt. Die auf dem Moloney murine leukemia Virus (MoMLV) basierende, nicht kommerzielle Transfektionsmethode benutzt eine Helferzelllinie (Phönix-eco Zellen) zur Produktion replikationsdefekter muriner Retroviren.

Da jedoch eine Transfektion mit Nur77 zu massiver Apoptose der Helferzelllinie führte, wurde eine weitere Transfektionsmethode, die Nucleofection eingesetzt.

2.3.1 Nucleofection

Bei dieser Transfektionsmethode handelt es sich um eine spezielle Form der Elektroporation. Sie unterscheidet sich von der herkömmlichen Elektroporation darin, dass nicht nur ein Spannungsimpuls gegeben wird, sondern eine Reihe von komplexeren Spannungsmustern erzeugt werden können. In Verbindung mit unterschiedlichen Puffersystemen ergeben sich somit eine Vielzahl von möglichen Transfektionsbedingungen.

Unglücklicherweise hält die Firma Amaxa sich sehr bedeckt was das Funktionsprinzip ihrer Methode angeht, so dass mir eine ausführlichere Beschreibung an dieser Stelle verwehrt bleibt.

Zur Transfektion wurden die Zellen mit Trypsinpuffer von der Platte abgelöst und in 7 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Thoma Zählkammer (HAAK) ausgezählt (5 Gruppenquadrate). Es wurden 1×10^6 – 5×10^6 HIB1B-Zellen und 2 µg DNA pro Transfektionsansatz eingesetzt. Die entsprechende Menge an Zellen wurde zentrifugiert (10 min, 200g, RT), das Zellpellet in 100 µl Nucleofectionsreagenz T aufgenommen und die zu transfizierende DNA zugesetzt. Nach Überführung in eine Elektroporationsküvette (AMAXA) wurden die Zellen elektroporiert (NUCLEOFECTOR I, AMAXA, Programm T-20) und sofort im Anschluss mit 500 µl Medium gemischt und auf Zellkulturschalen überführt. Bei Transfektionen von größeren Zellzahlen wurden mehrere parallele Ansätze vereinigt.

Die transfizierten Zellen konnten bereits 24 Stunden nach der Transfektion für die jeweiligen Experimente genutzt werden.

Material:

Cell Line Nucleofector™ Kit T

Nucleofector I™

Thoma Zählkammer: 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² pro Basisquadrat

2.3.2 Auswertung der Transfektionseffizienzen

Zur quantitativen Auswertung der Transfektionseffizienz wurde EGFP (*enhanced green fluorescent protein*, pEGFP-N1, PROMEGA) mit unterschiedlichen Methoden in HIB1B Zellen transfiziert. Mit einem *Fluorescent activated cell sorter* (FACS; FACSORT, BD BIOSCIENCE) wurden EGFP exprimierende Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CELLQuest Software (BD BIOSCIENCE).

2.4 Dual Luciferase-Reporterassays

Nur77 ist in der Lage an drei verschiedene DNA *Response Elements* binden. Als Monomer aktiviert es das NBRE (*NGFIB binding response element*) als Homodimer kann es NurRE (*Nur77 response element*) und als Heterodimer mit RXR α (*retinoic x receptor*) das RARE (*retinoic acid response element*) aktivieren. Um zu überprüfen welches *Response Element* von Nur77 in HIB1B Zellen nach β -adrenerger Stimulation angesprochen wird, wurden Reporterassays durchgeführt.

2.4.1 Transfektion der Reporterkonstrukte

Als Reporterkonstrukte standen die Photinus Vektoren pGL2 mit drei NBRE bzw. NurRE unter Kontrolle eines POMC-Promotors zur Verfügung. Zur Standardisierung wurde der Renilla Vektor pHRG-B eingesetzt.

In jeder Transfektion wurden 200 ng des Photinus Vektors und 1 μ g des Renilla Vektors verwendet. Zur Überexpression von Nur77 wurden 2 μ g Nur77 in pCDNA3 eingesetzt. Die Vektoren wurden durch Nucleofektion in HIB1B-Zellen eingebracht (Reagenz T, Programm T-20).

2.4.2 Induktion von Nur77 und Messung der Luciferase Aktivität

HIB1B-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion 90 bzw. 120 Minuten mit dem β -adrenergen Agonisten Isoproterenol (100nM) stimuliert, um Nur77 zu induzieren. Bei einigen Ansätzen wurden die Zellen zusätzlich zur β -adrenergen Stimulation mit Cyclosporin A (1 μ g/ml) behandelt. Von Cyclosporin A ist bekannt, dass es die Nur77-

DNA-Bindung blockiert (Yazdanbakhsh et al. 1995). Direkt im Anschluss wurde die Luciferase Aktivität gemessen.

Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 300 µl *Passive Lysis Buffer* zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler wurden die lysierten Zellen durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert.

In Acrylröhrchen (SARSTEDT) wurden 20 µl des Zelllysats mit 100 µl des Luciferase Assay Reagenz II (LAR2, PROMEGA) durch Pipettieren gemischt. In LAR2 befindet sich Luciferin, ATP und Mg^{2+} Ionen, so dass die Photinus Luciferase in der Lage ist Luciferin in Oxyluciferin umzuwandeln wobei Licht freigesetzt wird. Die Messung der Photinus Luciferase erfolgte in einem Luminometer (SIRIUS, BERTHOLD DETECTION SYSTEMS). Das Gerät wurde auf 2 Sekunden Vorlauf und 10 Sekunden Messung programmiert und ein gemittelter Wert für das 10 Sekunden Intervall als Messwert ausgegeben.

Zur Bestimmung der Renilla-Luciferase Aktivität wurde nach der ersten Messung 100 µl STOP&GLO Puffer (PROMEGA) hinzu gegeben. Mit diesem Puffer wird zum einen die Aktivität der Photinus-Luciferase unterdrückt und zum anderen das Substrat für die Renilla-Luciferase (Coelenterazine) bereitgestellt. Damit können beide Luciferasen im gleichen Ansatz gemessen werden.

Die Messung der Renilla-Luciferase erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Photinus Luciferase (s.o.).

Material:

Passive Lysis Buffer (PROMEGA)

Luciferase Assay Reagenz II (LAR2, PROMEGA)

Stop&Glo Puffer (PROMEGA)

2.5 Caspase 9 Assays

Zur Untersuchung der Apoptose induzierenden Wirkung von Nur77 in HIB1B-Zellen wurde die Menge an aktivierter Caspase 9 in den Zellen gemessen.

Der verwendete Caspase-Glo-9 Assay (PROMEGA) enthält eine inaktivierte Luciferase, die als Substrat für Caspase 9 dient und durch diese nach proteolytischer Spaltung aktiviert wird. Die aktivierte Luciferase kann dann in einem Luminometer als indirektes Maß für Caspase 9 Aktivität gemessen werden.

Ausdifferenzierte HIB1B-Zellen wurden in 96-Well Platten überführt und 24 Stunden kultiviert. Durch β -adrenerge Stimulation (Isoproterenol 100nM) wurde die Expression von Nur77 induziert oder die Zellen direkt mit Nur77 transfiziert. Nach unterschiedlicher Stimulationsdauer wurde das Caspase-Glo-9 Reagenz (100 μ l) auf die Zellen gegeben und 35 Minuten bei Raumtemperatur bei leichtem Schütteln inkubiert. Dies führt zu einer schnellen Lyse der Zellen und setzt damit alle aktivierten Caspasen frei und stabilisiert sie.

Die lysierten Zellen wurden in Acryl-Messröhrchen (SARSTEDT) überführt und für 10 Sekunden in einem Luminometer (SIRIUS, BERTHOLD DETECTION SYSTEMS) gemessen.

Material:

Caspase-Glo 9 Kit von PROMEGA

2.6 Stimulation mit Fettsäuren

Der Transkriptionsfaktor Nur77 kann in verschiedenen Zellsystemen durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli induziert werden. Im Kontext dieser Arbeit ist die Induktion durch Fettsäuren, die im Pankreas beschrieben wurde (Roche et al. 1999), von besonderem Interesse für die Untersuchung am braunen Fettgewebe. Daher wurde eine Stimulation mit der Fettsäure Oleat an HIB1B Zellen durchgeführt.

2.6.1 Vorbereiten der Fettsäurelösung

Die Stammlösung (50 mM Oleat) enthielt BSA, um die Löslichkeit der Fettsäuren zu erhöhen. Die Ratio Fettsäuren zu BSA betrug 6:1. Das Natriumsalz der Ölsäure wurde in Krebs-Ringer-Bicarbonat Puffer (KRBB) unter Rühren für acht Stunden gelöst. Um die Oxidation der Fettsäuren zu vermeiden wurde die Lösung mit Stickstoff durchspült und luftdicht verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

Material:

KRBB:

118,5 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,7 mM CaCl_2 , 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,1 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 5 mM Glucose

2.7 Klonierung von Nor1 und Nurr1 Sonden

Zur spezifischen Detektion von Nor1 und Nurr1 auf Northern-Blots wurden Sonden kloniert, die keine Kreuzreaktion innerhalb der Nr4a Kernrezeptorfamilie aufweisen. Zu diesem Zweck wurden Primer gewählt, die am Ende der kodierenden Sequenz binden bzw. in der 3'-untranslatierten Region. Als Matrize für die PCR-Reaktion wurden Plasmide mit Nor1 von *Rattus norvegicus* und Nurr1 von *Mus musculus* eingesetzt.

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden ausgeschnitten, aufgereinigt und in den Klonierungsvektor pGemT-Easy ligiert. Der Vektor wurde in Bakterien (*E.coli*, DH5 α) eingebracht und in einer Flüssigkultur vermehrt. Aus den Bakterien konnten die Plasmide in ausreichender Menge isoliert werden.

Durch Verdau mit EcoRI erhielt man, die zur Sondensynthese nötigen DNA-Fragmente.

Material:

Primer:

Nor1 Fw: GCCTTTTTGGAGCTGTTTGTCTT

Nor1 Rev: AGCCTGTCCCTTCCTCTGGTG

Nurr1 Fw: TCGTGGCTTTGGGAATGGAT

Nurr1 Fw: TTTGAAGTGCTTGGGAGGAGGTCT

2.8 RNA Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen und Gewebe erfolgte modifiziert nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al. 1987).

2.8.1 RNA Isolation aus Zellkultur

Auf Zellkulturschalen wurde in gefrorenem Zustand 1,8 ml SOLD gegeben und die Zellen mit einem Rubber-Policeman (ROTH) zusammengeschaßt. Das Gemisch wurde in 12 ml Röhrchen überführt und 200 μ l Natrium Acetat (2M, pH4), 400 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 1,8 ml saures Phenol (pH 4.5-5; ROTIPHENOL ROTH) zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C). Dies führte zu einer beschleunigten

Phasenauftrennung und die wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in neue 12 ml Röhrchen überführt und durch Zugabe von Isopropanol gefällt (-20°C, 30 min - 1 h). Im Anschluss an die Fällung wurden die Proben zentrifugiert (10.000 g, 15 min, 4°C) und das Pellet in 0,5 ml SOLD aufgenommen. Nach der zweiten Fällung mit Isopropanol (-20°C, 30 min) wurden die Proben erneut zentrifugiert (12.000 g, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 75% Ethanol gewaschen (10 min). Durch Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 10 min) wurde das RNA-Präzipitat erneut pelletiert und in nucleasefreiem Wasser (ULTRAPURE, GIBCO) aufgenommen. Um das Lösen des RNA-Pellets zu erleichtern wurden die Proben bei 63°C 10 min leicht geschüttelt und dann bei -80°C gelagert.

Material:

SOLD:

Guanidinthiocyanat 4M, Natriumcitrat 25mM pH7, Laurylsarcosyl 0,5%

2.8.2 RNA-Isolation aus Gewebe

In Stickstoff gefrorene BAT Proben wurden in 1,2ml Trizol[®] (INVITROGEN; enthält u.a. Guanidinthiocyanat und Phenol) gegeben und 60 Sekunden mit einem Ultra-Turrax (JANKE UND KUNKEL GMBH) homogenisiert. Das Homogenat-Trizol Gemisch wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (5min, 2500g, 4°C). An der Oberfläche bildete sich eine Fettschicht durch die man vorsichtig mit einer Pipette das darunterliegende Homogenat absaugen konnte. Das Gewebehomogenat wurde in neue Cups überführt und mit 240µl Chloroform versetzt. Nach kurzer Inkubation wurde erneut zentrifugiert (15min, 12.000g, 4°C) und die obere RNA-haltige Phase abgenommen. Durch Zugabe von Isopropanol wurde die RNA ausgefällt (30min, -20°C) und das nach Zentrifugation (15min, 12.000g, 4°C) erhaltene Pellet 10min in 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10min, 12.000g, 4°C) wurde das Pellet luftgetrocknet und in nucleasefreiem Wasser (ULTRAPURE, GIBCO) resuspendiert (20min bei 68°C).

Die Quantifizierung der RNA-Menge erfolgte photometrisch (ULTROSPEC 2100 PRO, AMERSHAM).

2.9 Northernblot-Analyse

2.9.1 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurden 1%ige denaturierende Agarosegele eingesetzt.

Nach der Elektrophorese wurde die Qualität der RNA auf einem UV-Schirm kontrolliert und auf einem Foto festgehalten. Bei nicht degradiert RNA sind die 28SrRNA-, 18SrRNA- und 5S rRNA-Banden deutlich zu erkennen, die zugleich als interner Größenbezug dienen. Die Detektion mit UV-Licht wird durch Ethidiumbromid möglich, das sich durch seine planare Struktur in die RNA einlagert.

Material:

MOPS-Puffer:

20mM 3-Morpholino-1-Proponsulfonsäure; 5mM Natriumacetat; 1mM Na₂EDTA;
5 % Formaldehyd (v/v)

2.9.2 Kapillartransfer auf Nylonmembranen

Die im Gel aufgetrennte RNA wurde durch einen Kapillarblot („*downward blotting*“) auf eine Nylonmembran (HYBOND N, AMERSHAM) übertragen (Chomczynski. 1992).

Nach dem Transfer wurde die Membran in einem UV-Crosslinker (STRATALINKER, STRATAGENE) zwei Minuten mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um die RNA auf der Membran zu fixieren.

2.9.3 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Detektion von spezifischen RNA-Molekülen auf dem Blot wurde mit radioaktiv markierten DNA-Sonden durchgeführt (siehe Tabelle 1). Die Herstellung der Sonden erfolgte nach dem *random priming* Prinzip mit Hilfe des REDIPRIME II™ Kits von AMERSHAM (25ng DNA; 50µCi [³²P] dCTP). Anschließend wurden die Sonden mit dem NUCRAP PROBE PURIFICATION COLUMN Kit (STRATAGENE) aufgereinigt.

Tabelle 1: DNA-Sonden

Gen	Spenderorganismus	Länge
Nur77	<i>Mus musculus</i>	417 bp
NOR1	<i>Rattus norvegicus</i>	309 bp
Nurr1	<i>Mus musculus</i>	393 bp
UCP1	<i>Rattus norvegicus</i>	1,2 kb

2.9.4 Hybridisierung

Nach dem Transfer wurde die Northernblots eine Stunde im Hybridisierungssofen bei 63°C in einer BSA-Hybridisierungslösung prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Vor der Zugabe der Sonde wurde diese denaturiert (100°C, 10min) und dann fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Hybridisierung mit der Membran erfolgte über Nacht bei 64°C (homologe Sonde) bzw. 63°C (heterologe Sonde). Zur Minimierung des Hintergrundes wurde die Membran in Waschlösungen (1-4) mit sinkender Salzkonzentration gewaschen, um unspezifisch gebundene Reste der Sonde von der Membran zu entfernen.

Material:

BSA-Hybridisierungslösung:

0,5M Natriumphosphat pH 7, 1mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA

Waschlösungen:

- (1) 2 x SSC 0,1 % SDS 15 min bei RT
- (2) 1 x SSC 0,1 % SDS 15 min bei RT
- (3) 0,5 x SSC 0,1 % SDS 10 min bei RT
- (4) 0,1 x SSC 0,1 % SDS 10 min bei 60 °C

2.9.5 Phosphorscreen und Analyse

Um eine quantitative Analyse spezifischer Transkripte auf dem Blot zu gewährleisten, wurden die mit radioaktiven Sonden hybridisierten Blots auf einen Phosphor-Screen (GP-SCREEN, MOLECULAR DYNAMICS) für 24h-48h aufgelegt.

Wenn ionisierende Strahlung auf einen Phosphor-Screen trifft, werden dort Elektronen in einen angeregten Zustand versetzt und der Screen speichert damit ein Abbild der Radioaktivitätsverteilung auf dem Blot. Bestrahlung des P-Screens in einem Phosphorimager (STORM860, MOLECULAR DYNAMICS) mit Laserlicht (HeNe

Laser, 632,8nm), führt zur Emission von messbaren Lichtquanten. Deren Intensität entspricht der auf den Phosphor Screen aufgetroffenen Menge an ionisierender Strahlung. Durch Verwendung dieser Technik lässt sich der dynamische Detektionsbereich radioaktiver Strahlung im Vergleich zu Röntgenfilmen deutlich vergrößern.

Die so erhaltenen digitalen Abbilder der Radioaktivitätsverteilung wurden mit der Analyse-Software Arrayvision 8.0 ausgewertet (IMAGING RESEARCH INC).

2.10 Isolation von Kernproteinen

Da Nur77 als Transkriptionsfaktor hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist, wurden die Proteine aus dem Zellkern isoliert. Um die Kernfraktion zu isolieren, wurden die Zellen zuerst in einem Lysepuffer (Puffer A) aufgenommen. Durch Zentrifugation (10min, 1000g, 4°C) wurden die Zellorganellen pelletiert und von der cytosolischen Fraktion im Überstand getrennt. Überführung der Zellorganellen in einen detergenezfreien Puffer (Puffer B) und erneute Zentrifugation (5min, 1000g, 4°C) trennte die Zellkerne von den restlichen Zellorganellen ab. Das Aufschließen der Zellkerne wurde durch Behandlung mit einem Ultraschallgerät erreicht. Erneute Zentrifugation (15min, 12.000g, 4°C) in einem Kernextraktionspuffer trennte die Zellkernproteine von den Membranbruchstücken.

Material:

Puffer A:

5mM KH_2PO_4 ; 150mM NaCl; 0,1mM DTT; 5mM MgCl_2 ; 10% Glycerin; 0,3% Triton X-100; 0,1mM EDTA; 1mM PMSF; 1mM Na_3VO_4

Puffer B:

5mM KH_2PO_4 ; 150mM NaCl; 1mM DTT; 5mM MgCl_2 ; 10% Glycerin; 0,1mM EDTA

Kernextraktionspuffer:

5mM KH_2PO_4 , 350mM NaCl, 1mM DTT, 5mM MgCl_2 , 10% Glycerin, 0,1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM Na_3VO_4

2.11 Herstellung von Nur77 und NOR1 Antikörpern

Zur Synthese von Antikörpern, die keine Kreuzreaktionen innerhalb der NR4a Familie zeigen, wurden schwach konservierte Bereiche aus der C-terminalen Ligandenbindenden Domäne (LBD) von Nur77 und NOR1 ausgewählt (siehe Abbildung 5).

```

      *           580           *           600           *           620           *           640
Nur77 NP 0 : VEEELQNPRIASLKEHMAIVAGDEQPA3CLSRLLGRLBELRLCTQGLQRIFFLKLEDLVPPPEIVDKIFMDTISF : 601
NOR1_AAF05 : VEEICTKITSSLRKHQRKGC---ALEPSEPKVLRAIVELRKTCTQGLQRIFFLKLEDLVPPPEVIDKIFLDTLFF : 627
      VEEL  4I  S  LK  H                      46L  L  ELR  6CTQGLQRIFF  LKLEDLVPPF  66DK6F6DTL  F

```

Abbildung 5: Zur Antikörperherstellung verwendete Peptidsequenzen für Nur77 (oben) und Nor1 (unten)

Die Synthese der Peptide, die Immunisierung der Tiere sowie die Gewinnung des Serums wurde von der Firma BIOSCIENCE durchgeführt.

2.11.1 Auswahl der Immunisierungspeptide

Bei der Auswahl der Peptidsequenzen wurde darauf geachtet, möglichst schwach konservierte und hydrophile Bereiche auszuwählen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden und eine ausreichende Löslichkeit bei der Immunisierung zu gewährleisten. Die Länge der zur Immunisierung eingesetzten Peptide sollte etwa 15 Aminosäuren betragen.

Um die Immunogenität der Peptide zu erhöhen wurden sie kovalent an einen Proteincarrier gekoppelt. In diesem Fall wurde *Keyhole limpet haemocyanin* (KLH) als Proteincarrier eingesetzt.

2.11.2 Immunisierung der Kaninchen

Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut abgenommen und Serum isoliert (Präimmunserum), um später Aussagen über den Gehalt an Antikörpern vor der Immunisierung machen zu können.

Die KLH-gekoppelten Peptide wurden den Kaninchen injiziert und die Immunisierungsreaktion nach vier und acht Wochen durch erneute Injektion verstärkt (Boost-Injektion). Vor jeder erneuten Injektion wurde ebenfalls Serum isoliert, um den Fortgang der Immunisierung überwachen zu können.

Drei Monate nach der ersten Injektion wurden die Kaninchen getötet und ausgeblutet.

2.11.3 Herstellung der Gelmatrix

Die Antikörper wurden mit Hilfe einer Sepharose-Gel-Matrix aufgereinigt, an die das Immunisierungspeptid kovalent gebunden wurde. Ohne diese Aufreinigung kann es

zu unspezifischen Reaktionen von anderen im Serum enthaltenen Antikörpern kommen.

Als Material für die Gelmatrix wurde CNBr-aktivierte Sepharose (AMERSHAM) eingesetzt, an die Peptide über ihre primäre Aminogruppe kovalent gebunden werden können.

Zuerst wurde 1g CNBr-aktivierte Sepharose in 10 ml 1mM HCl aufgenommen und dann in einer Säule mit Glasfritte gewaschen (500 ml 1mM HCl). Zur Neutralisierung der Matrix erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 250 ml Kopplungspuffer. Fünf Milligramm des Immunisierungspeptides wurde in 5 ml Kopplungspuffer aufgenommen und mit der gewaschenen Gelmatrix über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Matrix zentrifugiert (3 min, 300 g, 4°C) und der Überstand abgenommen. Mit Hilfe des Bradfordassays wurde kontrolliert ob im Überstand noch Protein zu detektieren ist. Bei gelungener Kopplung sollte das gesamte eingesetzte Immunisierungspeptid an die Matrix gebunden sein.

Die Gelmatrix wurde in 10 ml Tris-HCl pH8 resuspendiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Matrix erneut zentrifugiert (3 min, 300 g, 4°C) und viermal gewaschen. Die beiden ersten Waschschriffe erfolgten in Kopplungspuffer, dann wurde die Matrix noch zweimal in Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschschriff wurde die Matrix zentrifugiert (5 min, 300 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Die so hergestellte Gelmatrix konnte mit PBS überschichtet bei 4°C gelagert werden.

Material:

CNBr-aktivierte Sepharose von Amersham

Kopplungspuffer: 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl auf pH 8.3 einstellen

Waschpuffer: 0,1 M Essigsäure, 0,5 M NaCl auf pH 4 einstellen

2.11.4 Aufreinigung der Antikörper

Durch Inkubation des Serums mit der Gelmatrix kommt es zur Bindung der Antikörper an ihr spezifisches Antigen, das zuvor an die Gelmatrix gekoppelt wurde. Durch Waschen der Säule werden alle übrigen Bestandteile des Serums entfernt und schließlich die gebundenen Antikörper durch Veränderung der Pufferbedingungen von der Säule eluiert.

Die Gelmatrix wurde mit 10 ml des Serums durchmischt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach Zentrifugation (5 min, 300 g, 4°C) wurde der Überstand eingefroren und die Matrix zweimal mit PBS gewaschen. Die gesamte Gelmatrix wurde in eine Glassäule mit Glasfritte überführt und je einmal mit 10 ml Waschpuffer und 10 ml PBS gewaschen. In zehn Reaktionsgefäße wurden je 200 µl 1M Tris-HCl pH8 vorgelegt, um die Fraktionen des Eluats aufzunehmen. Durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer auf die Säule wurden die gebundenen Antikörper eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 700 µl in den vorbereiteten Reaktionsgefäßen aufgefangen und bei –20°C gelagert. Die Gelmatrix wurde mit PBS gewaschen und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Material:

Elutionspuffer: 0,2 M Essigsäure, 0,5 M NaCl auf pH 2.6 einstellen

2.12 Western Blot Analyse

Mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli. 1970) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach dem Molekulargewicht ihrer Monomere aufgetrennt. Durch SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und durch Erhitzen der Probe mit SDS und dem im Probenpuffer enthaltenen 2-β-Mercaptoethanol wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgelöst, so dass nur noch gestreckte Monomere vorliegen. Da die Proteine mit dem angelagerten SDS nun eine gleichmäßige negative Ladung besitzen, wandern sie zur Anode und trennen sich in dem elektrischen Feld ihrer Größe nach auf.

2.12.1 Probenvorbereitung

Es wurden 50 µg Protein mit dem gleichen Volumen Aceton 20 Minuten bei –20°C gefällt. Durch Zentrifugieren (10.000 g, 5 min, 4°C) wurde das Protein pelletiert und in 20 µl Probenpuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben dann bei 95°C drei Minuten denaturiert.

Material:**Probenpuffer:**

0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 0.1 M DTT, 10 % Glycerol, 0.1 % Bromphenolblau

2.12.2 Elektrophoretische Auftrennung

Zur Auftrennung der Kernextrakte wurden 10%ige Trenngele mit aufgegossenen 3%igen Sammelgelen aus Polyacrylamid verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Minigelanlage (BIORAD, MINI-PROTEAN II) durchgeführt. Bei einer Spannung von 160 V betrug die Laufzeit des Gels etwa eine Stunde. Um größere Proteine (>50 kDa) besser aufzutrennen wurde die Elektrophorese solange fortgeführt, bis die Laufront des Farbpuffers das Gel verlassen hatte.

Material:

Trenngel (10%):

10% Acrylamidlösung, 62,5mM Tris pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% AMPS, 0,05% TEMED

Sammelgel (3%):

3% Acrylamidlösung, 75mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,03% AMPS, 2% TEMED

Acrylamidlösung:

30% Acrylamid (w/v) 0,8% bis-Acrylamid (w/v) ROTIPHORESE GEL 30, ROTH

2.12.3 Western-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgte eine Übertragung (Halbtrocken-Blotting) auf eine Nitrocellulosemembran (HYBOND C EXTRA, AMERSHAM). Der Transfer wurde in einer Halbtrockentransferkammer (TRANS-BLOT SD, BIORAD) durchgeführt.

Die Filterpapiere und die Membran wurden vor dem Transfer etwa 5 Minuten in Transferpuffer gelegt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm² Membranfläche und einer Stunde Dauer. Die Transfereffizienz wurde durch eine Ponceau-Färbung der Membran überprüft. Durch die Färbung mit Ponceau-S-Lösung (3 min, kurzes Spülen mit ddH₂O) ist nach erfolgreichem Transfer ein gleichmäßiges Bandenmuster auf der Membran zu erkennen. Zudem führt die Färbung mit Ponceau-S-Lösung zur Fixierung der Proteine auf der Membran.

Material:

Transferpuffer:

48mM Tris, 1,3mM SDS, 20% Methanol, mit Glycin auf pH9,2 eingestellt

Ponceau-S-Lösung:

0,2% Ponceau S, 3% TCA

2.12.4 Immunologische Detektion mit Chemolumineszenz

Das auf der Membran gebundene Protein wurde mit einem für Nur77 spezifischen Antikörper detektiert. Der sekundäre Antikörper ist an eine Peroxidase (horseradish peroxidase, HRPO) gekoppelt und bindet spezifisch an den primären Antikörper.

Durch Zugabe eines geeigneten Substrates für die HRPO, in diesem Fall ECL Plus (AMERSHAM), kommt es zur Chemolumineszenz an der Stelle, wo der sekundäre Antikörper gebunden ist.

Zuerst wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt durch Inkubation in proteinreicher Lösung. Das Absättigen der Membran erfolgte über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blocking-Solution.

Die Primärantikörper wurden in AK-Puffer verdünnt (siehe Tabelle 2) und für zwei Stunden unter schütteln auf die Membranen gegeben. Anschließend wurden die Membranen viermal je fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen.

Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in AK-Puffer verdünnt (siehe Tabelle 2) und eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran auf einem Schüttler inkubiert. Danach folgten erneut vier fünfminütige Waschschrte mit Waschpuffer.

Durch Zugabe eines geeigneten Substrates für die Peroxidase des Sekundärantikörpers, in diesem Fall ECL Plus (AMERSHAM), kommt es zur Chemolumineszenz. Die Membran wurde in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm (X-OMAT AR, KODAK) aufgelegt. Die Expositionsdauer betrug zwischen 30 Sekunden und fünf Minuten je nach Stärke der Chemolumineszenz.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Name	Erzeugt in	Gegen	Verdünnung	Sekundärantikörper
2E1.1 MAK (J. Milbrandt)	Maus	Nur77 Maus	1:50	1:2000
Selbsthergestellt	Kaninchen	Nur77 Maus	1:80	1:2000
PharMingen Anti-Mouse Nur77	Maus	Nur77 Maus	1:750	1:10000

Material:Blocking Solution:

(20% FCS, 1% Casein, 0,05% Tween20 in PBS pH7,5) oder (5% Sojamehl, 0,05% Tween20 in PBS pH7,5)

AK-Puffer:

0,05% Tween20 in PBS pH 7,5

Waschpuffer:

0,05% Tween20, 1% Triton X-100, 0,1% SDS in PBS pH 7,5

Sekundärantikörper:

HRPO-konjugierter Sekundärantikörper Kaninchen anti-Maus bzw Ziege anti-Kaninchen (DIANOVA)

2.13 Genotypisierung von Nur77 Knockout Mäusen

Ein PCR-basiertes Verfahren wurde etabliert, um die Genotypisierung von Nur77 Knockout-Mäusen (Lee et al. 1995) im Gegensatz zur vorher verwendeten Southernblot-Analyse zu beschleunigen. Das Verfahren zur Genotypisierung basiert auf einer teilweisen PCR-Amplifikation der im zweiten Exon des Nur77 Gens integrierten Neomycinkassette, die eingebracht wurde um Nur77 „auszuschalten“.

2.13.1 DNA-Isolation aus Gewebe

Den Mäusen wurde ein Stück Gewebe am Ohr entnommen und auf Eis gelagert. Auf das Gewebestück wurden 21 µl NTES Puffer und 1µl Proteinase K (20 µg/µl) gegeben und 30 Minuten unter starkem Schütteln bei 55°C inkubiert. Nach Auffüllen mit ddH₂O auf 200 µl wurden die Proben für 10 Minuten in kochendem Wasser inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Im Anschluß wurden die Proben kurz eingefroren.

Mittels Phenol-Chloroform Extraktion wurde die DNA aufgeeignet, um die anschließende PCR-Reaktion zu vereinfachen. Dazu wurde dem verdauten Gewebe 200 µl Phenol und 20 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugesetzt und nach Zentrifugation (10 min, 15.000g, 4°C) der Überstand abgenommen. Um die genomische DNA zu fällen wurden 500 µl 100%iges Ethanol, 20 µl 3M Natriumacetat und 0,5 µl PelletPaint (INVITROGEN) zugegeben und die DNA bei -20°C für 25 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 17.000g, 4°C) wurde das Pellet 5 Minuten in 75%igem Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 15 µl Tris-HCl aufgenommen.

Material:

NTES: 50mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1%SDS

2.13.2 PCR-Reaktion

Um die Spezifität der anschließenden PCR-Reaktion zu gewährleisten, wurde eine „HotStart“-PCR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine spezielle Taq-Polymerase (ACCUPRIME II, INVITROGEN) verwendet. Diese Polymerase ist mit einem Antikörper blockiert, der sich erst bei hohen Temperaturen ablöst. Da sich bei geringen Temperaturen Oligonukleotide gehäuft unspezifisch an die Matrize anlagern können, wird durch den „HotStart“ eine unspezifische Amplifikation im ersten Zyklus verhindert. Zusätzlich befindet sich ein thermostabiles Hilfsprotein im ACCUPRIME II Mix, das dafür sorgt, dass sich die Spezifität der Oligonukleotidanlagerung in jedem Zyklus erhöht.

Es wurden 3 µl der aufgereinigten DNA, jeweils 1 µl von jedem der drei Primer, 12,5 µl ACCUPRIME II SUPERMIX und 6,5 µl ddH₂O für die PCR eingesetzt.

Material:**Primer:**

FW Primer: gtactcccaggaagtgactg

Rev Primer: cggaatagctctccccctcc

Neo Primer: ctcgtgctttacggtatcgc

2.14 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Um die Frage zu klären, ob Nur77 im braunen Fettgewebe an den Enhancer des UCP1 Gens bindet, wurden Chromatin-Immunopräzipitations-Assays (ChIP) durchgeführt. Mit dieser Methode kann die Interaktion von Proteinen mit bestimmten DNA-Abschnitten untersucht werden. Zu diesem Zweck werden DNA-assoziierte Proteine durch chemische Quervernetzung an ihrer jeweiligen Bindestelle fixiert. Anschließend wird die genomische DNA durch Ultraschallbehandlung in etwa 500bp große Fragmente geschnitten. Durch eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen das jeweils untersuchte Protein können die DNA-Abschnitte isoliert werden, die zum Zeitpunkt der Fixierung mit dem Protein assoziiert waren. Durch eine Aufhebung der Quervernetzung erhält man ein komplexes Gemisch aus DNA-Fragmenten, in dem durch PCR-Amplifikation nach bestimmten DNA-Abschnitten gesucht werden kann.

2.14.1 Fixieren der Zellen

Durch die Zugabe von 190 µl 37%igem Formaldehyd zu den Zellen (bei 7ml Medium Endkonzentration 1%) wurden DNA-assozierte Proteine direkt an ihrem Bindeort fixiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml 1M Glycin zugegeben und die Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS und 2,5 mM PMSF versetzt und mit einem Rubber-Policeman zusammengeschaßt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 2000rpm, 4°C) und das Pellet in 1ml SDS-Lysis-Puffer resuspendiert.

Material:

SDS-Lysis Puffer:

1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,1, 1mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail von Roche

2.14.2 Fragmentierung der DNA

Die Dauer und Intensität der Ultraschall Behandlung wurde darauf abgestimmt, Fragmente mit einer Größe von etwa 500 bp zu erhalten. In SDS-Lysis Puffer aufgenommene Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 13mal für je 10 Sekunden bei niedrigster Stufe mit einem Ultraschallgerät (SONIFIER B-12, BRANSON SONIC POWER COMPANY) zerschallt. Bei dieser Prozedur war besonders darauf zu achten Schaumbildung zu vermeiden. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand abgenommen. Davon wurden 10% als Input Kontrolle zur späteren Verwendung bei –20°C gelagert. Der Rest wurde 10fach in ChIP-Verdünnungspuffer verdünnt.

Material:

ChIP-Verdünnungspuffer:

0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail von Roche

2.14.3 Immunopräzipitation

Zuerst wurden 30 µl Salmon Sperm DNA / Protein A Agarose Beads (UPSTATE) mit 100 µl ChIP Verdünnungspuffer gewaschen und abzentrifugiert (2 min, 2500 rpm).

Um unspezifische Bindung der Proben an den Agarose Beads während der Immunopräzipitation zu vermeiden wurden die Proben zu den Beads gegeben und für eine Stunde bei 4°C rotiert (ROTATOR, NEOLAB). Dadurch werden alle Elemente aus den Proben herausgefischt, die mit den Agarose Beads interagieren können (Preclearing).

Zum Überstand wurde nach Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, 4°C) 1 µg Antikörper (Nur77 bzw. RXR α) gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Um die Antikörper mit den gebundenen Protein/DNA Komplexen zu isolieren wurden 60 µl Salmon Sperm DNA /Protein A Agarose Beads zugegeben und eine Stunde bei 4°C auf einem Rotator inkubiert.

Durch kurze Zentrifugation (1 min, 1000 rpm, 4°C) wurden die Beads pelletiert. Die Beads wurde mehrmals je fünf Minuten auf einem Rotator gewaschen und durch Zentrifugation (2 min, 2000 rpm) pelletiert. Es wurden folgende Waschpuffer eingesetzt: 1x Niedrig Salz Immunkomplex Wasch Puffer, 1x Hoch Salz Immunkomplex Wasch Puffer, 1x LiCl Immunkomplex Wasch Puffer und 2x TE. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 250 µl Elutionspuffer aufgenommen und 15 Minuten unter Rotieren gewaschen. Dadurch löst sich die Verbindung zwischen den Antikörpern und den Beads. Die Proben wurden kurz zentrifugiert (1 Min, 1000 rpm) der Überstand in ein neues Gefäß überführt und das Pellet erneut mit 250 µl Elutionspuffer gewaschen (s.o.). Der Überstand der ersten Elution wurden mit dem der zweiten vereinigt.

Material:

Niedrig Salz Immunkomplex Wasch Puffer:

0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 150mM NaCl

Hoch Salz Immunkomplex Wasch Puffer:

0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl

LiCl Immunkomplex Wasch Puffer:

0,25M LiCl, 1% NP40, 1% Deoxycholat, 1mM EDTA 10mM Tris-HCl pH 8.1

TE-Puffer:

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0

Elutionspuffer:

1% SDS, 0,1 M NaHCO₃

Antikörper:

monoklonaler Nur77 Antikörper von BD Biosciences (PharMingen)

RXR α Antikörper von Santa Cruz

2.14.4 Aufhebung der Quervernetzung und PCR Analyse

Die nach der Fragmentierung eingefrorene Input Kontrolle wurde ab hier genauso weiterbehandelt wie die immunopräzipitierten Proben.

Um die Quervernetzung der Proteine mit der DNA aufzuheben wurden den Proben 20 µl 5 M NaCl zugegeben und im Wasserbad bei 65°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben mit 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl Tris-HCl pH6.5 und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) für eine Stunde auf 45°C erhitzt. Die so von Proteinen befreiten DNA-Fragmente wurden mit 20 µg Glykogen versetzt und mit einer Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt. Nach Präzipitation mit Ethanol wurde das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen und luftgetrocknet.

Mit der aufgereinigten DNA aus der Input Kontrolle wurde auf einem Agarosegel die gleichmäßige Fragmentierung der DNA überprüft, die idealerweise Bruchstücke einer Größe von etwa 500 bp haben sollte.

Zur Analyse der durch ChIP gewonnen DNA-Fragmente wurde in einer PCR Reaktion der UCP1-Enhancer sowohl in den Proben als auch in der Input Kontrolle (1:10 und 1:50 verdünnt) amplifiziert. Zum Test der Spezifität des ChIP Experimentes wurde ebenfalls versucht eine Region 1 kb stromaufwärts des UCP1-Enhancers zu amplifizieren.

Material:

Primer:

Ucp1 Enhancer FW: CATCTTAAGAGAAGAGCTCGGACAC

Ucp1 Enhancer Rev: CGTGATGTGAATTCAAGGCAGGGA

Upstream FW: TGCAGTTGGGTAGTGGTGGTG

Upstream Rev: ACAATAACCATAGCTGCAGCCACATTA

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von Nur77 durch Fettsäuren

Beta-adrenerge Stimulation von braunen Fettzellen führt u.a. zu einer schnellen Aktivierung der Hormon-sensitiven-Lipase, die freie Fettsäuren aus gespeicherten Triglyceriden abspaltet. Zum einen aktivieren die freien Fettsäuren das *Uncoupling Protein 1* (Locke et al. 1982) zum anderen nehmen sie Einfluss auf die Regulation verschiedener Gene (Distel et al. 1992). Aus Untersuchungen an pankreatischen β -Zellen ist bekannt das Oleat in der Lage ist die Expression von Nur77 zu induzieren (Roche et al. 1999).

In diesem Experiment sollte untersucht werden ob die Expression von Nur77 auch in braunen Adipozyten durch Oleat induzierbar ist.

Ausdifferenzierte HIB1B-Zellen wurden mit Zugabe von 0,5 mmol Oleat zum Zellkulturmedium unterschiedlich lange stimuliert (30 min bis 6h). Nach Isolation der RNA wurde die Expression von Nur77 mittels Northernblot-Analyse untersucht.

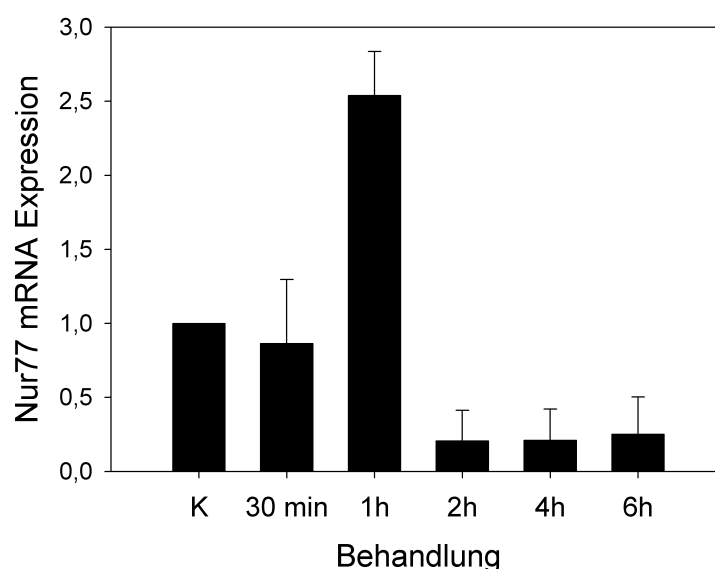


Abbildung 6: Densitometrische Quantifizierung der Nur77-mRNA Expression nach Oleat Stimulation. Dargestellt ist der auf die Kontrollbehandlung bezogene Mittelwert (n=2). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes

Nach 30 Minuten Oleat-Stimulation war noch keine Veränderung der Nur77 mRNA Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen. Nach einer Stunde Stimulation war jedoch eine deutliche Steigerung in der Expression zu beobachten. Zu den weiteren Zeitpunkten (2h, 4h und 6h) befand sich Nur77mRNA am Rande des Detektionslimits (Abbildung 6).

3.2 Expression von Nur77 während der Differenzierung von braunen Adipozyten in Kultur

Beide Typen von Fettzellen entstehen aus den gleichen Vorläuferzellen, differenzieren aber im Laufe ihre Entwicklung entweder zu braunen oder zu weißen Adipozyten (Rosen et al. 2000). Die molekularen Mechanismen dieser Aufspaltung in zwei unterschiedliche Adipozytentypen sind weitestgehend unbekannt.

Die bekannten Differenzierungsfaktoren (z.B. C/EBP's und PPAR γ) sind sowohl im braunen als auch im weißen Fett vorhanden. Der PPAR γ -Coactivator 1 (PGC1) hingegen wird ausschließlich im braunen Fettgewebe exprimiert (Puigserver et al. 1998).

In braunen Fettzellen wurde Nur77 als ein durch β -adrenerge Stimulation induzierbares Gen entdeckt (Kanzleiter et al. In Vorbereitung). Da β -adrenerge Stimulation auch zu Proliferation und Differenzierung von braunen Präadipozyten führt (Kozak et al. 1994), bestand die Vermutung, dass Nur77 auch an diesen Prozessen beteiligt sein könnte.

3.2.1 Nur77 mRNA Expression während der Differenzierung brauner Adipozyten (HIB1B)

Die Nur77-mRNA-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung von HIB1B Zellen untersucht. HIB1B Zellen benötigen etwa 9 Tage in Kultur, um zu braunen Adipozyten auszdifferenzieren.

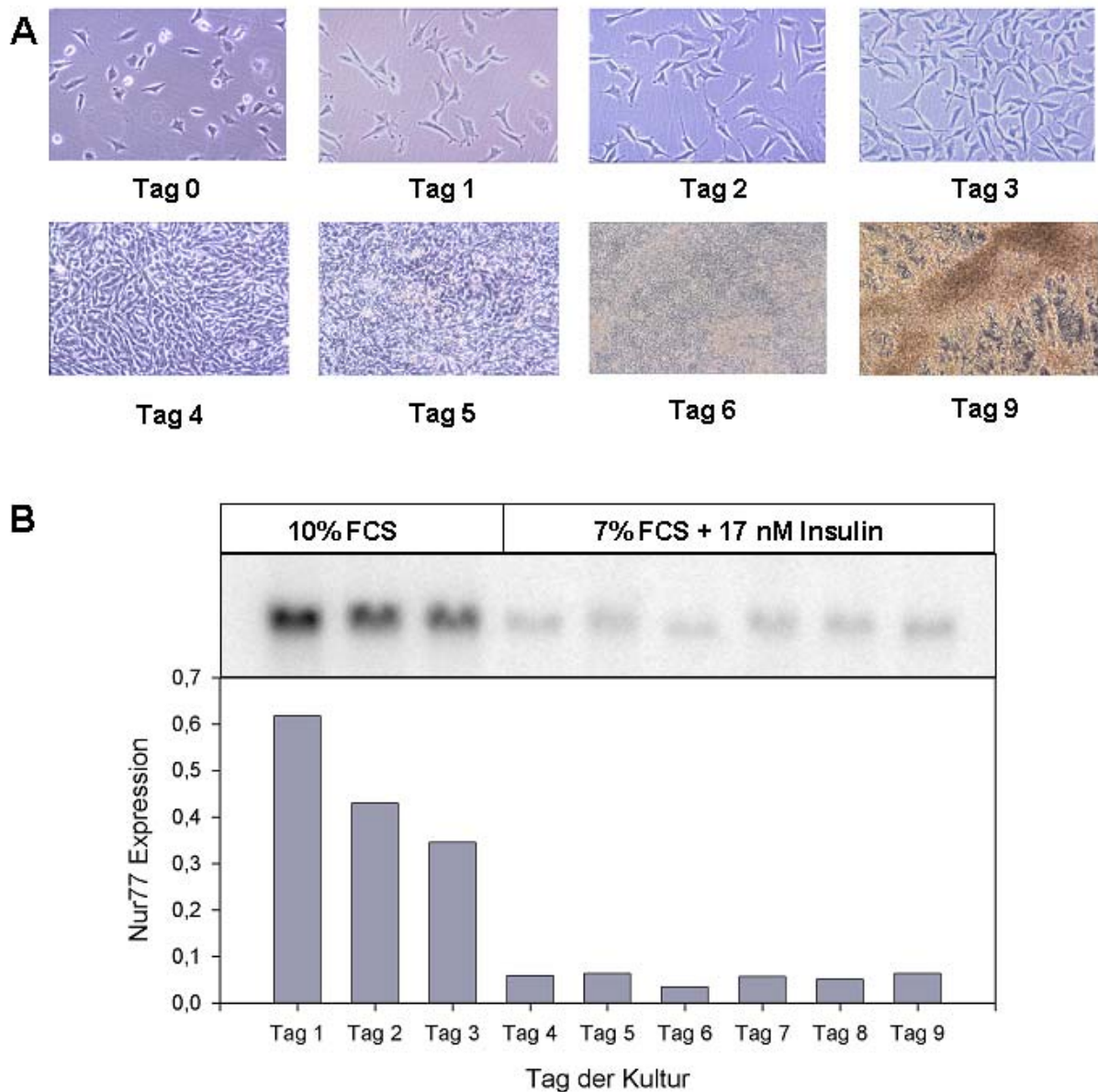


Abbildung 7: A: HIB1B Zellen während der Proliferations- (Tag1-3) und Differenzierungsphase (Tag4-9); B: Northernblot-Analyse der Nur77-mRNA-Expression von Tag 1 bis 9

In den ersten drei Tagen der Kultur proliferieren die Zellen. Die Differenzierung wird an Tag 4 eingeleitet, wenn die Zellen konfluent gewachsen sind (Abbildung 7A). Zu diesem Zeitpunkt wird die Zusammensetzung des Zellkulturmediums geändert. Der FCS-Gehalt wird von 10% auf 7% abgesenkt und dem Medium 17 nM Insulin zugegeben, um die Differenzierung der Zellen einzuleiten. Am sechsten Tag sind optische Anzeichen der Differenzierung erkennbar (Einlagerung von Lipiden und Braunfärbung).

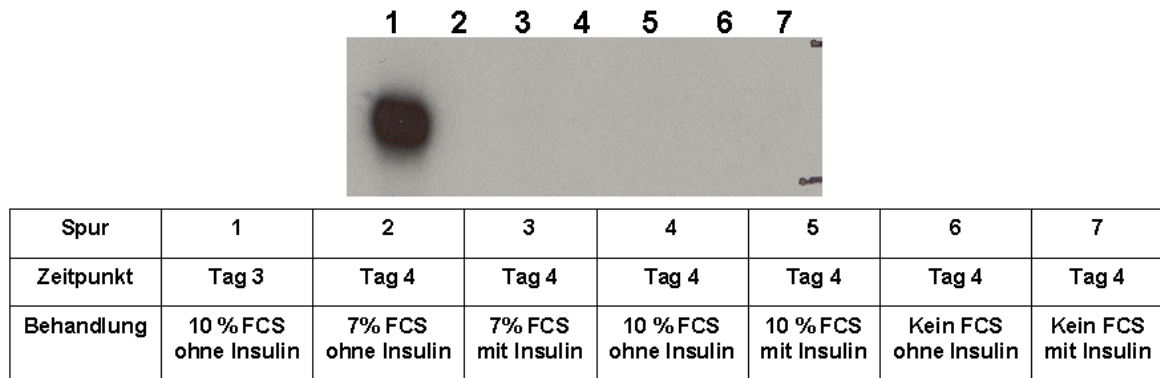


Abbildung 8: Northernblot-Analyse der Nur77 mRNA Expression in HIB1B-Zellen an Tag 3 und Tag 4 der Differenzierung mit unterschiedlichen Mediumszusätzen

An jedem Tag wurden Zellen geerntet und RNA isoliert. Die Analyse der RNA auf einem Northernblot zeigte eine starke Expression von Nur77 während der ersten drei Tage der Kultur. Diese nimmt vom ersten Tag an ab und erreicht am vierten Tag ein kaum noch detektierbares Maß (Abbildung 7B).

Um auszuschließen, dass die Reduktion im FCS-Gehalt (10% auf 7%) und die Zugabe von Insulin am vierten Tag zu einer Beeinflussung der Nur77-mRNA-Expression führt, wurde der Versuch wiederholt und die Zusammensetzung des Mediums am vierten Tag variiert (Abbildung 8).

Während am Tag 3 unter normalen Bedingungen (Abbildung 8 [Spur 1]) Nur77-mRNA detektiert werden konnte, war an Tag 4 der Kultur bei keiner getesteten FCS-Insulin Kombination Nur77 nachweisbar (Abbildung 8 [Spur 2-7]).

3.2.2 Nur77-mRNA-Expression während der Differenzierung weißer Adipozyten (3T3L1)

Es wurden fünf verschiedene Zeitpunkte während der Differenzierung von 3T3L1 Zellen betrachtet. Sowohl in der Proliferationsphase (Abbildung 9 [Spur 2]) als auch zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung (Abbildung 9 [Spur 3-6]) war keine Detektion von Nur77 mRNA möglich.

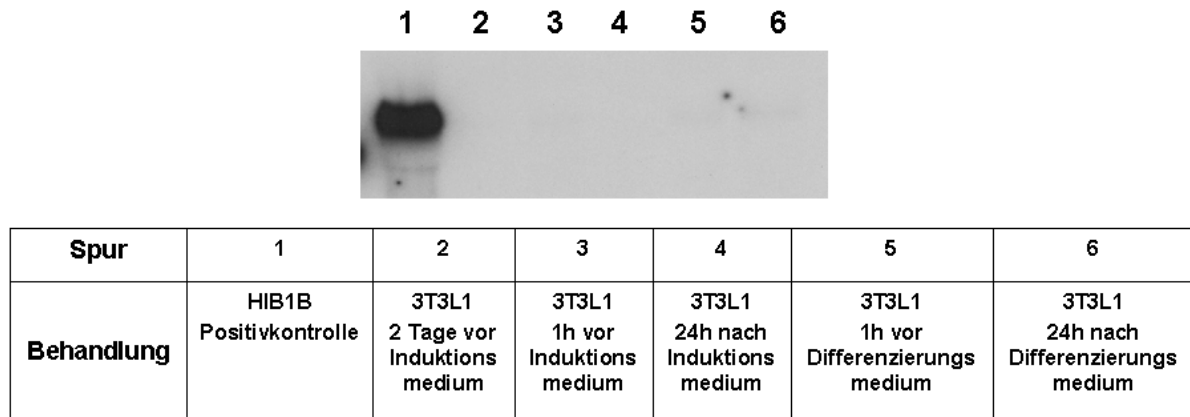


Abbildung 9: Northernblot-Analyse der Nur77-mRNA-Expression während der Differenzierung von 3T3L1 Zellen

3.3 Regulatorischer Effekt von Nur77 auf den UCP1-Enhancer in HEK Zellen

In den Diplomarbeiten von Christoph Eickhorst (2004) und Florian Bolze (2004) wurden Reporterergenassays mit dem UCP1-Enhancer in HEK293-Zellen durchgeführt und der Einfluss von Nur77 untersucht.

HEK293-Zellen wurden mit einem Reportergenkonstrukt, das eine Luciferase unter Kontrolle des UCP1-Enhancers trug, transfiziert. Da bekannt ist, dass der UCP1-Enhancer von PPAR γ /RXR α Heterodimeren aktiviert wird (Lowell et al. 2000), wurden die Zellen mit PPAR γ -, RXR α - und Nur77-Expressionsvektoren transfiziert.

Kotransfektion des Reporterkonstruktes mit nur einem der Expressionsvektoren führte zu keiner Änderung der gemessenen Luciferase Aktivität im Vergleich zur basalen Aktivität des Reporterkonstruktes (Abbildung 10).

Bei Kotransfektion mit PPAR γ und RXR α kam es jedoch erwartungsgemäß zu einer deutlichen Aktivierung des UCP1-Enhancers (4,5-fach). Interessanterweise konnte diese PPAR γ /RXR α vermittelte Aktivierung durch Nur77 reprimiert werden (2,4-fach; Abbildung 10).

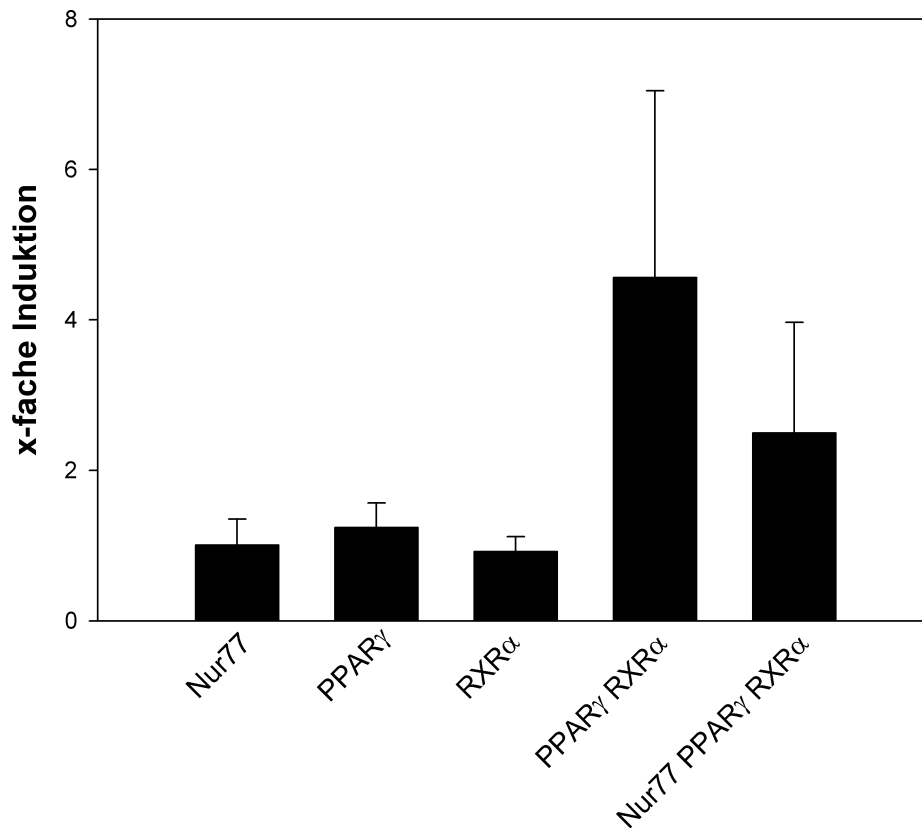


Abbildung 10: Mittelwerte der Aktivität des UCP1-Reportergenkonstruktes in HEK293-Zellen nach Kotransfektion mit verschiedenen Faktoren bezogen auf die basale Aktivität des Konstruktes. (Nur77 n=10; PPAR γ und RXR α je n=7; PPAR γ /RXR α n=17 und PPAR γ /RXR α /Nur77 n=20; Fehlerbalken repräsentieren den Fehler des Mittelwertes, Daten von C.Eickhorst und F.Bolze)

3.4 Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer in HIB1B-Zellen

Da sich in den Experimenten von Christoph Eickhorst und in den Wiederholungsexperimenten von Florian Bolze ein Einfluss von Nur77 auf die Aktivität des UCP1-Enhancers andeutete (3.3 oben), wurde die *in vivo*-Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer untersucht. Durch Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) von HIB1B-Zellen mit einem Nur77-Antikörper, wurden DNA-Fragmente isoliert und auf Anwesenheit des UCP1-Enhancers untersucht. Als Positivkontrolle wurde parallel eine ChIP mit einem RXR α -Antikörper durchgeführt.

3.4.1 ChIP Analyse ausdifferenzierter HIB1B-Zellen

Ausdifferenzierte HIB1B-Zellen wurden eine Stunde mit Isoproterenol (100nM) stimuliert und anschließend durch Zugabe von Formaldehyd alle Protein-DNA Komplexe fixiert. Durch Behandlung mit Ultraschall wurde die genomische DNA der Zellen in etwa 500 bp große Fragmente geschnitten (Abbildung 11A).

Durch Immunopräzipitation der geschnittenen Chromatinfragmente mit einem Nur77- bzw. RXR α -Antikörper und anschließender Aufhebung der Protein-DNA-Quervernetzung, wurde ein komplexes Gemisch von DNA-Fragmenten gewonnen. In dem Gemisch befanden sich alle zum Zeitpunkt der Quervernetzung von Nur77 bzw. RXR α gebundenen DNA-Abschnitte. Durch eine PCR-Reaktion mit Primern, die den UCP1-Enhancer amplifizieren, wurde überprüft ob dieser mit Nur77 bzw. RXR α assoziiert war.

In den Inputkontrollen konnte der UCP1-Enhancer erwartungsgemäß amplifiziert werden (Abbildung 11B). Aber auch in den mit Nur77 bzw. RXR α präzipitierten Proben konnte der UCP1-Enhancer sowohl in den Präzipitaten unstimulierter (K) wie auch β -adrenerg stimulierter HIB1B-Zellen (ISO) nachgewiesen werden (Abbildung 11B). Da es sich hierbei nicht um einen quantitativen Ansatz handelt, kann aus der Signalstärke der Amplifikation jedoch keine Aussage über die Menge des DNA-assoziierten Proteins abgeleitet werden.

Mit den gleichen Proben wurde eine PCR durchgeführt, die ein Fragment 1,5 kb stromaufwärts des UCP1-Enhancers amplifiziert, um auszuschließen, dass DNA-Fragmente unspezifisch präzipitiert wurden. Nur in der Inputkontrolle konnte dieses Fragment amplifiziert werden (Abbildung 11C).

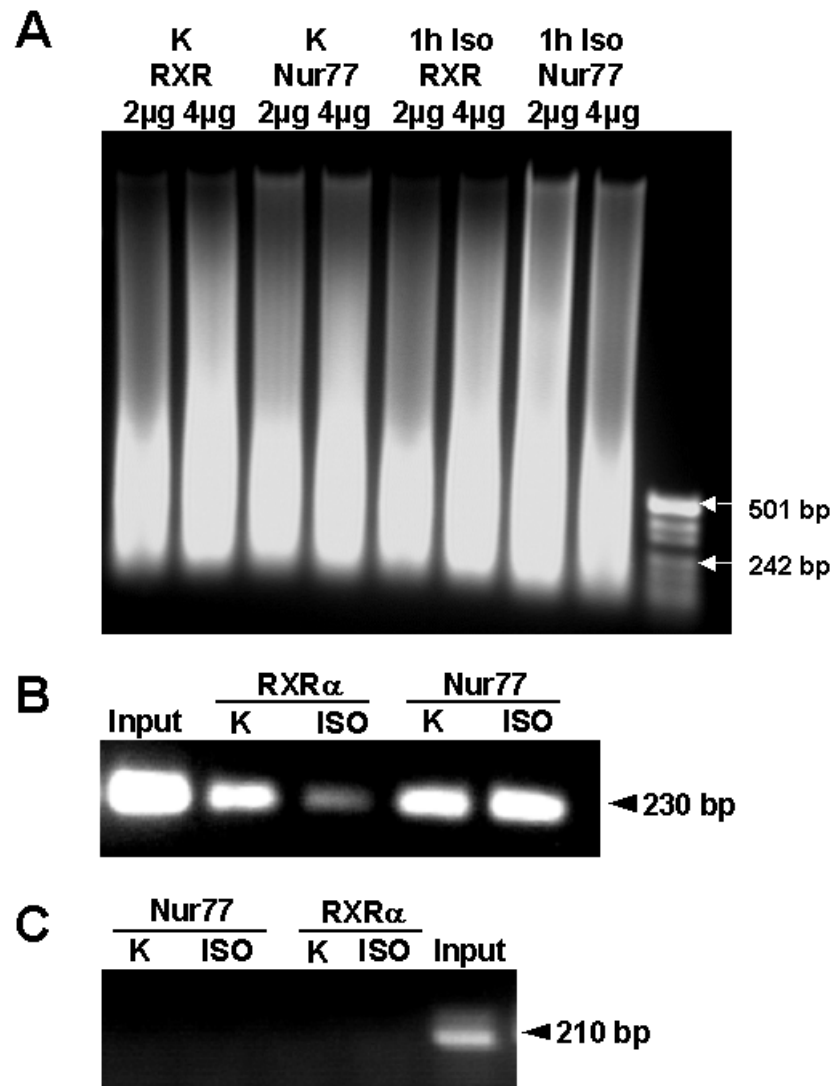


Abbildung 11: Nur77 und RXR α ChIP-Analyse mit ausdifferenzierten HIB1B-Zellen, A: Durch Ultraschall geschertes Chromatin, B: PCR-Amplifikation des UCP1-Enhancers aus Inputkontrolle und ChIP-Proben, C: Spezifitätskontrolle durch PCR-Amplifikation eines Fragmentes 1,5kb stromaufwärts des UCP1-Enhancers (K: unstimuliert, ISO: 1h Isoproterenol 100nM)

3.4.2 ChIP-Analyse nicht differenzierter HIB1B-Zellen

Nicht differenzierte HIB1B-Zellen wurden eine Stunde mit Isoproterenol (100nM) oder β -Nerve Growth Faktor (β -NGF;100ng/ml Medium) stimuliert und im Anschluss eine Chromatin Immunopräzipitation mit Nur77 bzw. RXR α Antikörpern durchgeführt.

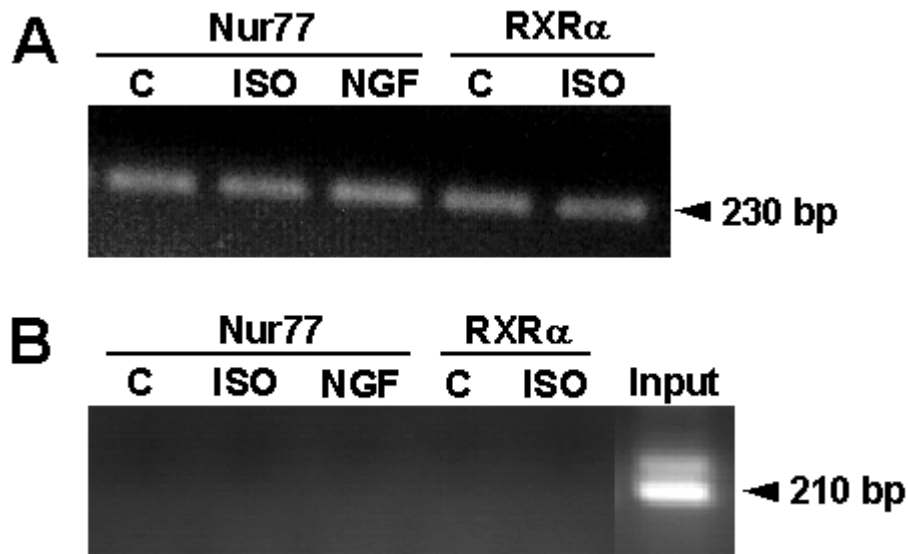


Abbildung 12: Nur77 und RXR α ChIP-Analyse mit nicht differenzierten HIB1B-Zellen, A: PCR-Amplifikation des UCP1-Enhancers aus ChIP-Proben, B: Spezifitätskontrolle durch PCR-Amplifikation eines Fragmentes 1,5kb stromaufwärts des UCP1-Enhancers

In den Nur77-Präzipitaten konnte sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach Stimulation mit Isoproterenol oder NGF der UCP1-Enhancer amplifiziert werden (Abbildung 12A). Gleiches gilt für die RXR α -Präzipitate, bei denen in den unbehandelten Zellen sowie nach Stimulation mit Isoproterenol jeweils der UCP1-Enhancer amplifiziert werden konnte (Abbildung 12A).

Die Spezifität der Präzipitation wurde durch Amplifikation eines 1,5 kb stromaufwärts des UCP1-Enhancers gelegenen Fragmentes überprüft. In keiner der ChIP-Proben konnte das Fragment amplifiziert werden, aber in allen Input Kontrollen war dieses DNA-Segment anwesend (Abbildung 12B).

3.5 Transfektion von HIB1B-Zellen

3.5.1 Optimierung der Nucleofektionsbedingungen

Sowohl Calcium-Phosphat als auch Liposomen-basierte Transfektion von HIB1B Zellen ergaben nur sehr geringe Transfektionseffizienzen. Ein zunächst eingesetztes retrovirales Transfektionssystem lieferte zwar höhere Transfektionseffizienzen, erwies sich jedoch leider als ungeeignet. Bei retroviralen Transfektionen mit Nur77

bzw. einer dominant negativen Form kam es zu einem Absterben der verwendeten Helferzelllinie und damit zu unzureichend hohen Virustitern.

Daher wurde das von Amaxa entwickelte Verfahren der Nucleofektion getestet. Es handelt sich dabei um eine spezielle Version der Elektroporation, bei der eine Vielzahl von verschiedenen Transfektionspuffern und Elektroporationsprogrammen kombiniert werden können. Verschiedene Puffer/Programm-Kombinationen wurden an HIB1B Zellen getestet. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen wurde ein GFP-Expressionsvektor transfiziert und die Zellen an einem FACS-Gerät ausgezählt.

Tabelle 3: Transfektionseffizienzen der Nucleofektion mit unterschiedlichen Puffer/Programm Kombinationen in HIB1B-Zellen

Puffer	Programm	Effizienz %	Tot %	Puffer	Programm	Effizienz	Tot %
R	Nur GFP	1,94	3,46	T	Nur GFP	1,87	2,48
R	A 23	19,96	3,74	T	A 23	41,42	3,03
R	A 27	4,31	3,84	T	A 27	10,77	4,69
R	T 20	60,31	9,33	T	T 20	71,52	10,36
R	T 27	46,26	12,35	T	T 27	65,59	10
R	T 16	48,28	10,06	T	T 16	56,61	14,49
R	T 01	34,14	4,58	T	T 01	35,88	3,25
R	G 16	31,39	8,96	T	G 16	39,37	6,92
R	O 17	34,38	7,11	T	O 17	X	X
V	A 23	38,44	8				
V	A 27	13,43	7,84				
V	T 20	66,18	14,76				
V	T 27	67,9	11,5				
V	T 16	69,72	9,01				
V	T 01	60,05	5,59				
V	G 16	58,23	8,72				
V	O 17	59,2	8,88				

Bei jedem der drei verwendeten Transfektionspuffer (R, T, V) wurde die höchste Transfektionseffizienz mit einem Programm der Kategorie T erzielt. In Kombination mit Puffer R erwies sich das Programm T 20 als wirkungsvoll und erreichte eine Transfektionseffizienz von 60,31% bei 9,33% toten Zellen. Mit Puffer V wurde die höchste Effizienz bei Programm T 16 mit 69,72% erreicht und 9,01% toten Zellen. Als beste Transfektionsbedingung erwies sich die Kombination aus Puffer T und Programm T 20 bei der 71,52% Effizienz und 10,36% tote Zellen gemessen wurde (Tabelle 3).

3.5.2 Quantifizierung der Transfektionseffizienzen

Um die Transfektionseffizienz zu quantifizieren wurden GFP transfizierte HIB1B-Zellen in einem FACS-Gerät ausgezählt. Als Vergleich wurden mit Liposomen (LIPOFECTAMINE, INVITROGEN) transfizierte HIB1B-Zellen gemessen. Die Messung der durch Nucleofection transfizierten Zellen erfolgte 24h nach Transfektion. Die mit Lipofectamine behandelten Zellen wurden nach 48h gemessen.

Auf der X-Achse der FACS-Auswertung ist die Größe der Zellen aufgetragen und auf der Y-Achse die Intensität der Fluoreszenz (Abbildung 13). Der Graph ist in vier Quadranten aufgeteilt: Unten Links (LL) sind Zelltrümmer ohne Fluoreszenz dargestellt, unten Rechts (LR) intakte Zellen ohne Fluoreszenz, Oben links (UL) sind fluoreszierende Zelltrümmer und oben rechts (UR) intakte fluoreszierende Zellen.

Unter %Total ist der prozentuale Anteil der Gesamtzellzahl angegeben, der sich im jeweiligen Quadranten befinden. Alle Zellen im Quadrant UR wurden als transfiziert und alle Zellen im Quadrant LL als tot gewertet.

Mit der Liposomen basierten Transfektion wurde eine Effizienz von 0,84% erreicht. Die gezeigte Nucleofection erreichte eine Effizienz von 71,52% (Puffer T, Programm T 20). Da bei den Lipofectamin-transfizierten Zellen vor der Quantifizierung methodisch bedingt das Medium gewechselt wurde, konnten keine Angaben über die Letalität der Transfektion gemacht werden. Beim direkten Vergleich der Transfektionseffizienzen muss man jedoch darauf achten, dass bei der Auswertung der mit Nucleofection transfizierten Zellen der Schwellenwert für GFP-Fluoreszenz niedriger liegt. Dadurch ergibt sich eine Überschätzung der tatsächlichen Transfektionseffizienz.

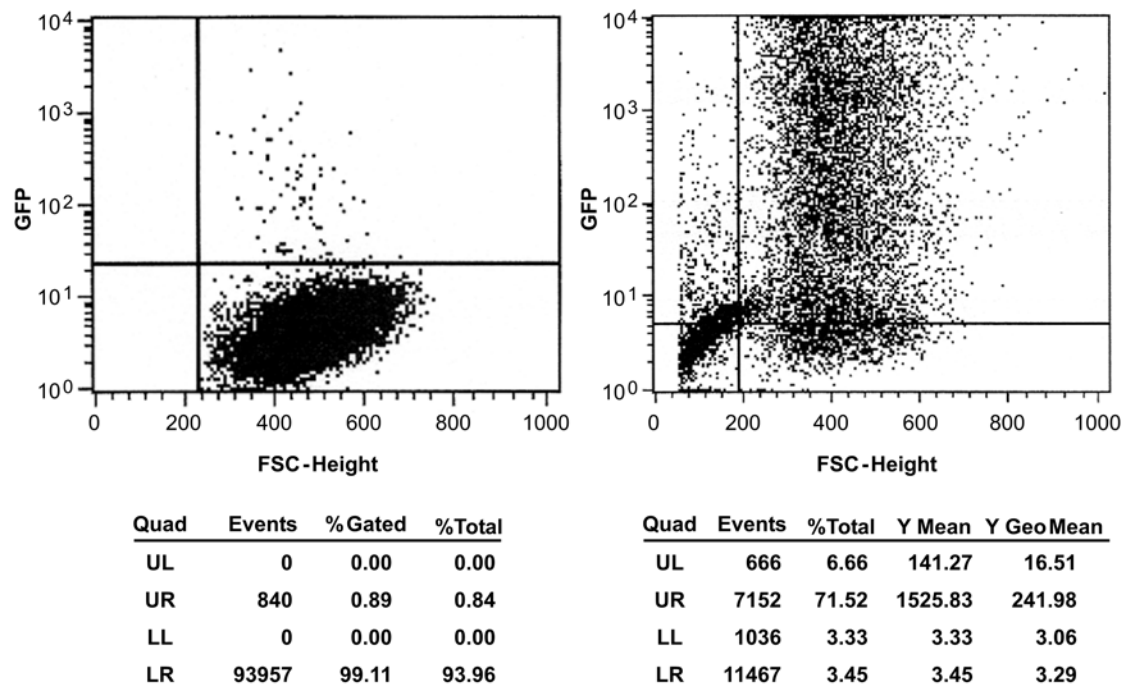


Abbildung 13: FACS-Analyse der GFP-Expression in HIB1B Zellen nach Transfektion, Links: Liposomen basierte Transfektion (Lipofectamine), Rechts: Nucleofektion in Puffer T mit Programm T 20

Mit Hilfe der Nucleofektion war es nun möglich eine Reihe von transfektionsabhängigen Experimenten wie z.B. Reporterassays, Überexpression etc. in HIB1B-Zellen durchzuführen.

3.6 Aktivierung des NBRE und NurRE in HIB1B Zellen nach β -adrenerger Stimulation

Alle Mitglieder der Nr4a Kernrezeptorfamilie (Nur77, NOR1 und Nurr1) sind in der Lage als Monomer das *Response Element* NBRE (*NGFIB binding response element*) zu aktivieren. Ein weiteres *Response Element* - das NurRE (*Nur77 response element*) - wird durch Homo- oder Heterodimere der NR4a-Familienmitglieder angesprochen (Maruyama et al. 1998). Mit Hilfe von Reporterassays sollte die Aktivität dieser beiden Elemente in HIB1B Zellen untersucht werden.

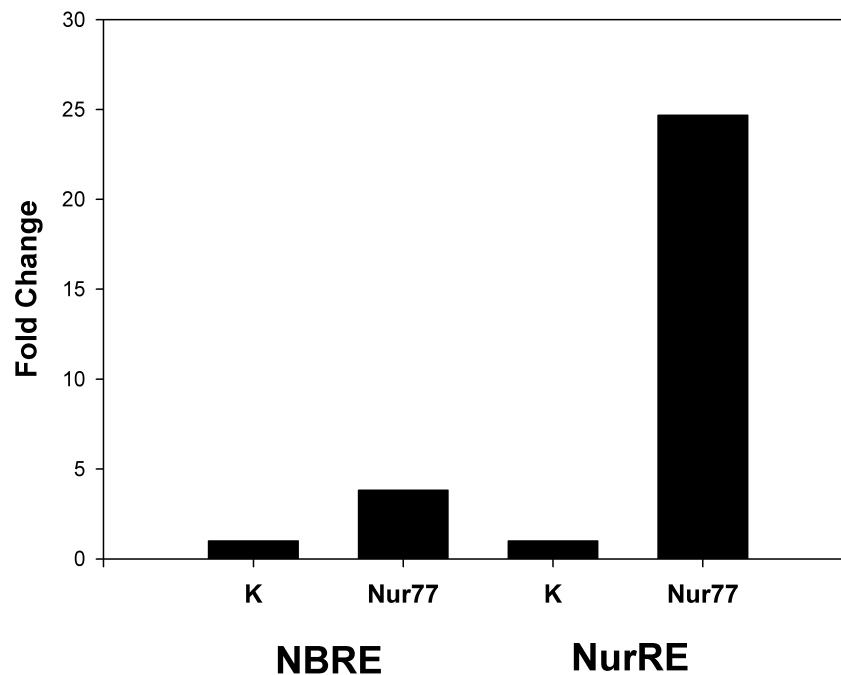


Abbildung 14: Fold Change Werte der Pluc/Rluc Ratios (bezogen auf K); NBRE und NurRE Reporterkonstrukte wurden in HIB1B-Zellen transfiziert; K: Kontrolle, Nur77: Kotransfektion mit Nur77

3.6.1 Aktivität von NBRE und NurRE bei Überexpression von Nur77 in HIB1B-Zellen

HIB1B-Zellen wurden mit Reportergerkonstrukten transfiziert, die entweder das NBRE oder das NurRE unter der Kontrolle eines POMC-Promoters trugen. Nur77 wurde kotransfiziert, um die Funktion der Reportergerkonstrukte zu testen.

Kotransfektion mit Nur77 führte bei beiden Konstrukten zu einer deutlichen Steigerung der gemessenen Luciferase Aktivität. Bei NBRE-transfizierten Zellen zeigte sich eine 3,8fache Erhöhung der Reporteraktivität im Vergleich zur Kontrolle. Bei NurRE transfizierten Zellen war eine Steigerung um das 24,7fache zu beobachten.

3.6.2 Aktivität von NBRE und NurRE nach β -adrenerger Stimulation in HIB1B-Zellen

HIB1B-Zellen wurden mit NBRE oder NurRE Reportergerkonstrukten transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion für 90 Minuten mit Isoproterenol (100nM) β -adrenerg stimuliert.

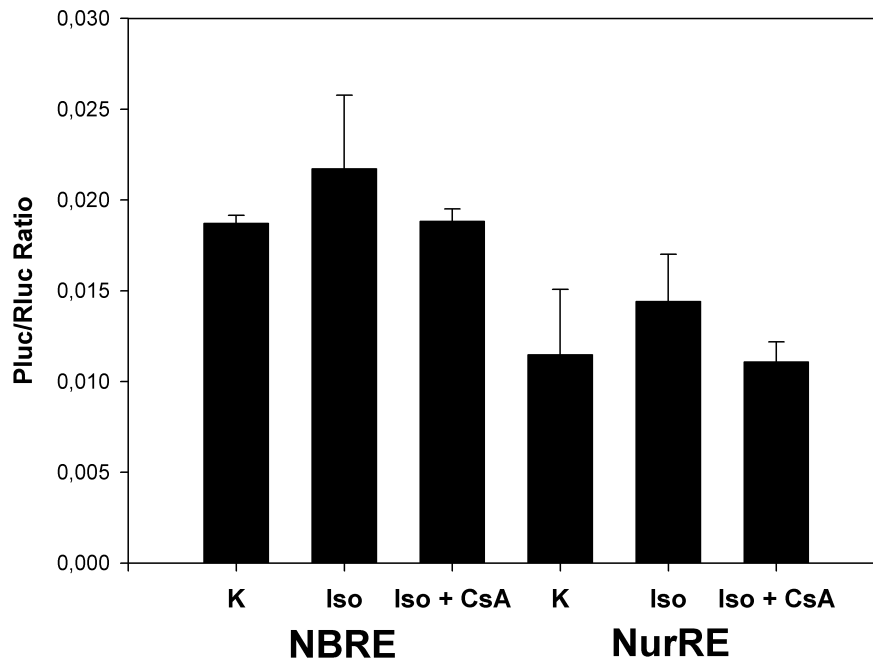


Abbildung 15: Ratios der Pluc/Rluc Werte mit NBRE und NurRE Reportergenkonstrukten in HIB1B-Zellen (n=2); K: Kontrolle, Iso: 90min Isoproterenol, Iso+CsA: 90min Isoproterenol + Cyclosporin A (1µg/ml)

Aus Arbeiten an T-Zellen ist bekannt, dass die DNA-Bindung von Nur77 durch Cyclosporin A (CsA) gehemmt werden kann (Yazdanbakhsh et al. 1995). Deshalb wurde in diesem Experiment getestet, ob CsA die Aktivierung des NBRE und NurRE verhindern kann.

Bei den Messungen mit dem NBRE Reportergenkonstrukt kommt es durch die Stimulation mit Isoproterenol zu einem leichten Anstieg der gemessenen Lichtmenge (1,2-fach), die jedoch durch Zugabe von CsA (1µg/ml) wieder auf das Kontrollniveau absinkt (Abbildung 15).

Die Ergebnisse mit dem NurRE Reportergenkonstrukt zeigen ebenfalls einen Anstieg nach Stimulation mit Isoproterenol (1,25-fach) und eine Hemmung dieses Effektes bei gleichzeitiger Gabe von CsA (Abbildung 15).

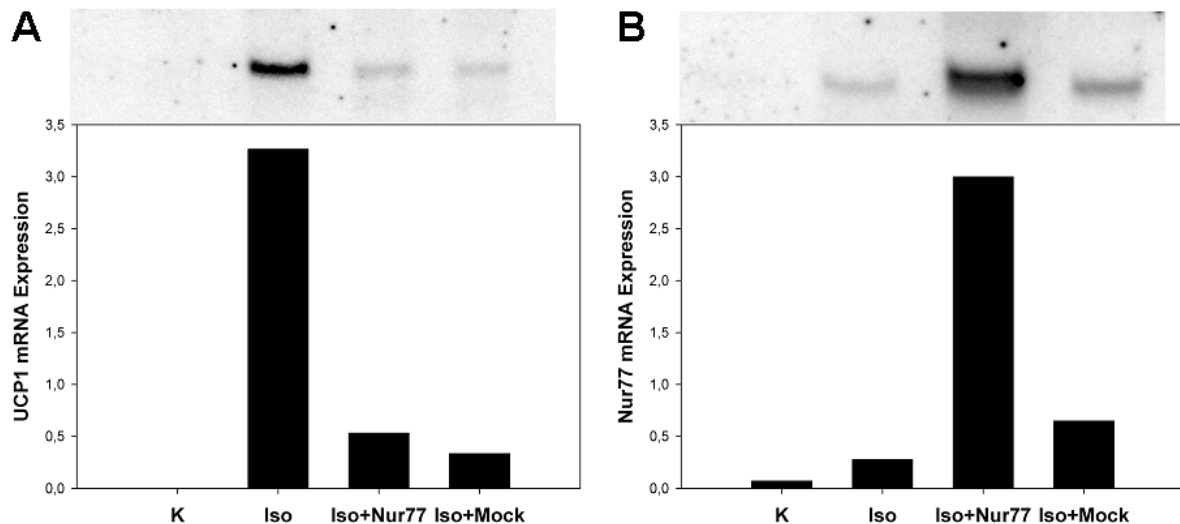


Abbildung 16: Northernblot-Analyse von HIB1B-Zellen A: UCP1-RNA Expression, B: Nur77-RNA Expression; (K: Kontrolle, Iso: Isoproterenol Stimulation 4h 100nM, Nur77: Nur77 Transfektion, Mock: Transfektion mit leerem Vektor; Y-Achse in relativen densitometrischen Einheiten)

3.7 UCP1 Expression in Nur77 transfizierten HIB1B-Zellen

Die in den ChIP-Experimenten gezeigte *in vivo*-Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer in HIB1B-Zellen (3.4) und die UCP1-Enhancer Reporterassays in HEK-Zellen (3.3) legen einen Einfluss von Nur77 auf die Regulation der UCP1-Expression nahe. Daher wurden Nur77- bzw. Mock-transfizierte (leerer Vektor) und nicht transfizierte HIB1B-Zellen β -adrenerg stimuliert und die UCP1-Expression mittels Northernblot Analyse untersucht.

In nicht behandelten HIB1B Zellen (Kontrolle) konnte keine UCP1-Expression detektiert werden. Beta-adrenerge Stimulation in nicht transfizierten Zellen (4h Iso) zeigte eine starke Induktion der UCP1-mRNA. Bei Nur77 transfizierten Zellen zeigte sich nach Stimulation mit Isoproterenol (4h Iso) nur eine schwache Expression von UCP1-mRNA, die jedoch der Expression bei Mock-transfizierten Zellen entsprach (Abbildung 16A).

Da die Transfektion alleine bereits einen Einfluss auf die UCP1-mRNA Expression zeigte, wurde der gleiche Northernblot mit einer Nur77-Sonde hybridisiert, um zu untersuchen, ob es sich um generell erniedrigte RNA-Expression nach Nucleofektion handelt.

In nicht behandelten HIB1B-Zellen war keine Nur77-mRNA zu detektieren. Stimulation mit Isoproterenol führte zu einer Induktion von Nur77, die durch Mock Transfektion noch leicht erhöht wurde (Abbildung 16B). Ein genereller Effekt auf die RNA-Expression kann damit ausgeschlossen werden.

3.8 Einfluss von Nur77 auf Caspase 9-induzierte Apoptose in HIB1B-Zellen

Die Funktion von Nur77 bei der Apoptose von T-Zellen ist vielfach untersucht und gut charakterisiert (Calnan et al. 1995; Winoto. 1994; Woronicz et al. 1994). In T-Zellen transloziert Nur77 aus dem Zellkern nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors zu den Mitochondrien. Dort bewirkt es die Freisetzung von Cytochrom C (Li et al. 2000) was wiederum zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Caspasen sind Proteasen, die als inaktive Pro-Caspasen jederzeit in der Zelle vorliegen, aber nur in apoptotischen Zellen aktiviert werden und somit die Mediatoren der Apoptose darstellen (Raff. 1998).

Um zu klären, ob Nur77 auch in braunen Fettzellen apoptotische Wirkung hat, wurde indirekt die Aktivität von Caspase 9 in HIB1B-Zellen gemessen. Eine durch Caspase 9 aktivierbare Luciferase wurde mit Lysaten von HIB1B-Zellen inkubiert und in einem Luminometer deren Aktivität bestimmt.

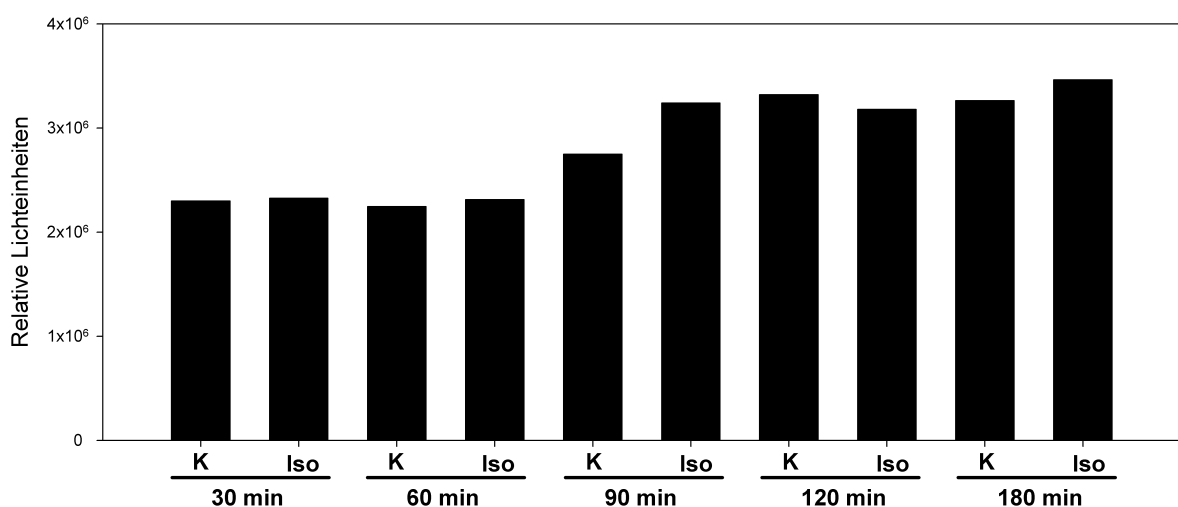


Abbildung 17: Messung der Caspase 9-induzierten Luciferase-Aktivität in β -adrenerg stimulierten HIB1B-Zellen (K: Kontrolle unstimuliert, Iso: Isoproterenol)

Da Nur77-Protein in unstimulierten HIB1B-Zellen nur in sehr geringen Mengen vorliegt, wurden die Zellen für 30 Minuten bis 3 Stunden mit Isoproterenol (100nM) stimuliert.

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wurden auch nicht stimulierte HIB1B-Zellen gemessen, um Effekte durch längere Kultivierungszeiten ausschließen zu können. Die Caspase 9-Aktivität war zu fast allen Zeitpunkten der Isoproterenol-Stimulation (30min, 60min, 120min und 180min) annähernd auf dem Niveau der unstimulierten Zellen. Nach 90min Stimulationsdauer war eine geringfügige Erhöhung der Caspase 9-Aktivität im Vergleich zur Kontrollbehandlung zu beobachten (Abbildung 17).

Es war jedoch ein genereller Anstieg in den Messwerten mit zunehmender Kultivierungsdauer zu beobachten, die vermutlich auf einer Erhöhung der Zellzahl durch Proliferation zurückzuführen ist (Abbildung 17).

Die Wirkung der Überexpression von Nur77 wurde ebenfalls untersucht. Die Caspase 9 Aktivität wurde vier bzw. 24 Stunden nach Transfektion mit Nur77 gemessen. Bei der Messung der transfizierten Zellen wurden zusätzlich auch Zellen gemessen, die nur mit einem leeren Vektor transfiziert wurden (Mock), um Effekte zu erfassen die durch die Transfektionsprozedur verursacht wurden.

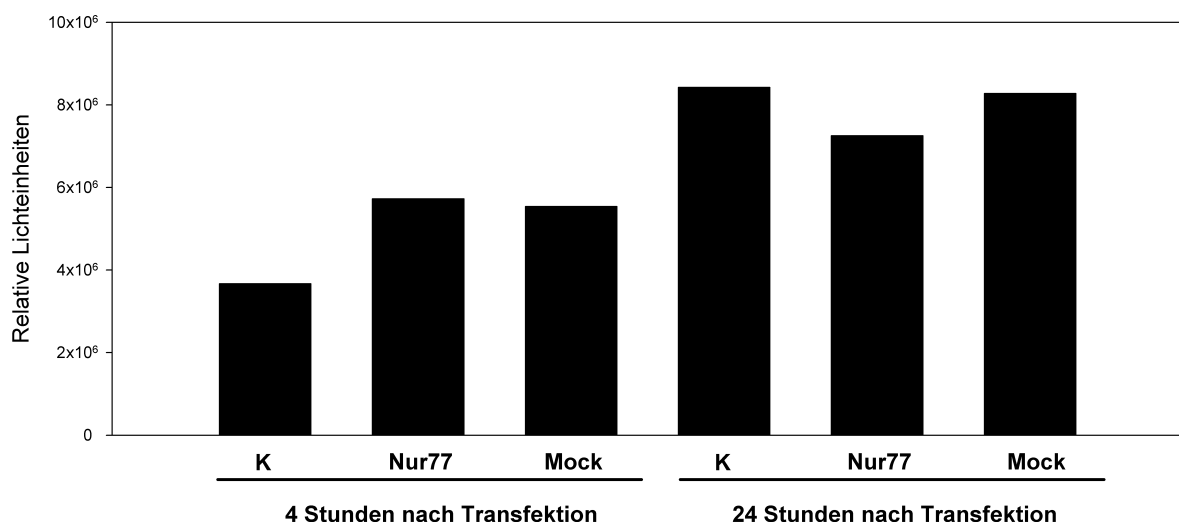


Abbildung 18: Messung der Caspase 9-induzierten Luciferase-Aktivität transfizierten HIB1B-Zellen 4 bzw. 24 Stunden nach Transfektion (K: Kontrolle nicht transfiziert aber gleiche Zellzahl, Nur77: Transfektion mit Nur77-Expressionsvektor, Mock: Transfektion mit leerem Expressionsvektor)

In den transfizierten Zellen war vier Stunden nach Transfektion sowohl bei den Nur77- als auch bei den Mock-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine leicht erhöhte Caspase 9-Aktivität zu beobachten. Nach 24 Stunden waren die Messwerte der Kontrolle und der Mock-Transfektion in etwa gleich und die Nur77-transfizierten Zellen zeigten eine etwas geringere Caspase 9-Aktivität (Abbildung 18).

3.9 Induktion von NOR1 und Nurr1 in Nur77-Knockout Mäusen

Trotz vielfältiger Untersuchung der Nur77-Knockout-Mäuse (Crawford et al. 1995; Kilduff et al. 1998; Lee et al. 1995; Walter. 2003) konnte bisher keine Auswirkung des Knockouts auf den Phänotyp entdeckt werden. Erst vor kurzer Zeit wurde ein milder Phänotyp in Nur77-Knockout-Mäusen in Bezug auf die Anfälligkeit für Katalapsie durch Dopaminantagonisten beschrieben (Ethier et al. 2004).

Da Nur77 bei der negativen Selektion von autoimmunreaktiven T-Zellen im Thymus eine essentielle Rolle spielt (Woronicz et al. 1994), jedoch auch in diesem Kontext kein Phänotyp zu beobachten ist, liegt der Verdacht einer Kompensation durch eines der anderen Nr4a-Familienmitglieder nahe. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in transgenen Mäusen, die eine dominant negative Form von Nur77 in T-Zellen exprimieren, massive Defekte bei der Apoptose von T-Zellen auftreten (Zhou et al. 1996).

Da auch die metabolische Charakterisierung von Nur77-KO-Mäusen keinen Phänotyp aufzeigte (Walter. 2003), wurde untersucht, ob die beiden anderen Nr4a-Familienmitglieder NOR1 und Nurr1 ebenfalls im braunen Fettgewebe exprimiert werden.

3.9.1 Genotypisierung von Nur77 Knockout Mäusen

Zur Vereinfachung der Genotypisierung wurde ein PCR-basiertes Verfahren etabliert, das es ermöglicht, mit kleinen Gewebeproben (Earpunch) zu arbeiten.

In einer kompetitiven Hotstart-PCR mit drei Primern wurde ein Teil des Exon2 von Nur77 (Primer A und B) bzw. ein Teil der beim Knockout eingebrachten Neomycinkassette (Primer C) amplifiziert (Abbildung 19A). Auf Grund der Größe der Neomycinkassette (1,7kb) kam es bei Knockout Tieren nicht zu einer Amplifikation mit den beiden Nur77-Exon2 Primern (Abbildung 19A, Primer A und B).

Das PCR-Produkt für das Wildtyp-Allel hatte eine Größe von 1100 bp und das Knockout-Allel resultierte in einem 700 bp großen Produkt (Abbildung 19B).

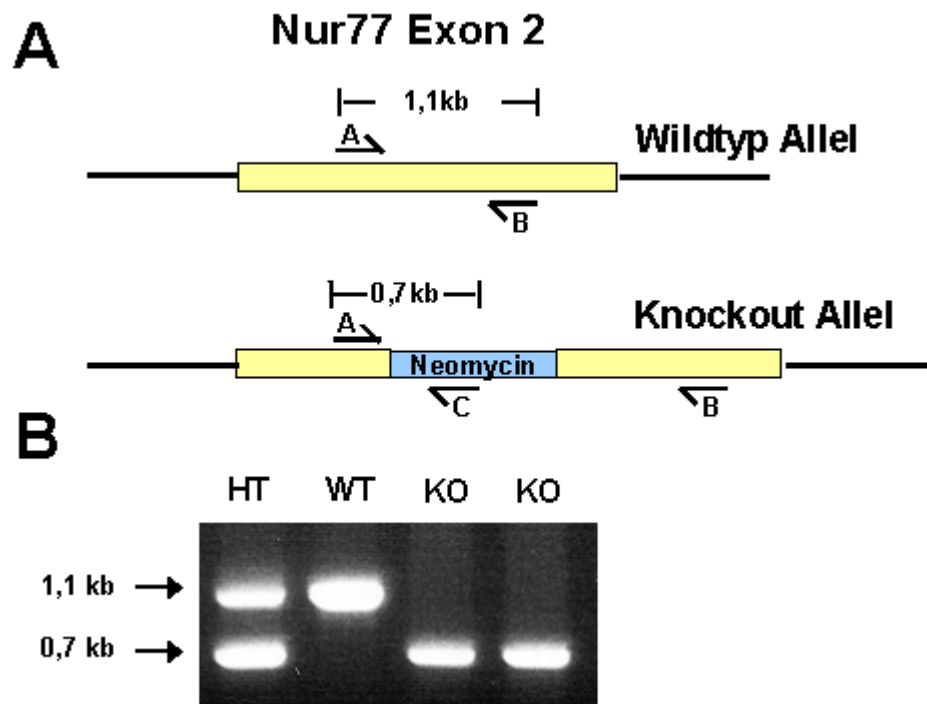


Abbildung 19: Genotypisierungsstrategie für Nur77-KO-Mäuse, A: Struktur des Wildtyp und Knockout-Allels; Zwei Primer wurden im Exon 2 (A und B) und einer in der Neomycinkassette (C) gesetzt, B: Kompetitive Hotstart-PCR mit drei Primern (WT: Wildtyp, HT: Heterozygot, KO: Knockout)

3.9.2 Detektion von NOR1 und Nurr1 im braunen Fettgewebe

Nur77-KO-Mäuse aller drei Genotypen wurden mit Futter *ad libitum* für eine Stunde einer Temperatur von 4°C ausgesetzt oder als Kontrolle bei Raumtemperatur gehalten. Die Kälteexposition erfolgte in vorgekühlten Makrolon Käfigen mit minimaler Einstreu. Die Mäuse wurden durch CO₂-Betäubung und Genickbruch getötet und das interscapuläre braune Fettgewebe entnommen. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels Northernblot-Analyse untersucht. Zur Synthese radioaktiver Sonden wurden Fragmente der NOR1- bzw. Nurr1- cDNA eingesetzt, die Kreuzreaktionen innerhalb der Nr4a Familie ausschließen.

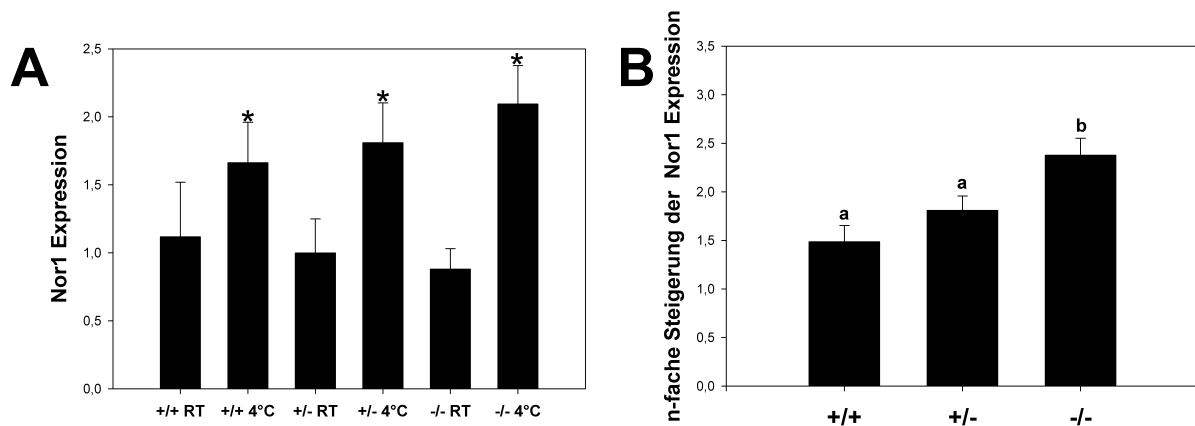


Abbildung 20: Vergleich der Nor1-mRNA-Expression im interscapularen BAT von Wildtyp (+/+), Heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Nur77-KO-Mäusen, die bei Raumtemperatur (RT) gehalten wurden oder eine Stunde Kälteexposition bei 4°C ausgesetzt waren (4°C); (A) Densitometrische Quantifizierung der Nor1-mRNA-Expression, Kälteexposition zeigte eine signifikante Erhöhung der Expression in allen drei Genotypen (ANOVA, $p < 0,05$), Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standarddfehler von $n=8$ Mäusen mit Ausnahme von +/+ mit $n=4$ Tieren; (B) Mittlere n-fache Steigerung (\pm Standardfehler) der Nor1-mRNA-Expression nach einstündiger Kälteexposition. KO-Mäuse zeigten eine erhöhte Nor1-Induktion im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen (ANOVA, $p < 0,01$), Mit dem Holm-Sidak Test durchgeführte post-hoc pairwise Vergleiche zeigten signifikante Unterschiede zwischen -/- vs. +/+ ($a = p < 0,01$) und -/- vs. +/- ($b = p < 0,05$)

Untersuchung der NOR1-mRNA-Expression ergab einen signifikanten Anstieg der Expression nach einstündiger Kälteexposition bei allen Genotypen (Abbildung 20 A). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

Wenn jedoch der Anstieg nach Kälteexposition auf die bei Raumtemperatur ermittelte mRNA-Expression bezogen wird, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Die stärkste Induktion (2,4fach) war bei den homozygoten Nur77-KO-Mäusen zu erkennen (Abbildung 20 B).

Ein ähnliches Bild ergab die Untersuchung der Nurr1-mRNA-Expression. Einstündige Kälteexposition der Tiere führte zu einem deutlichen Anstieg der Nurr1-RNA-Menge in allen drei Genotypen (Abbildung 21). Aufgrund der geringeren Tierzahlen, besonders bei den Wildtyp-Tieren ($n=1$), im Vergleich zur Untersuchung der Nor1-Expression konnte jedoch kein sinnvolles statistisches Verfahren zur Überprüfung signifikanter Unterschiede angewandt werden.

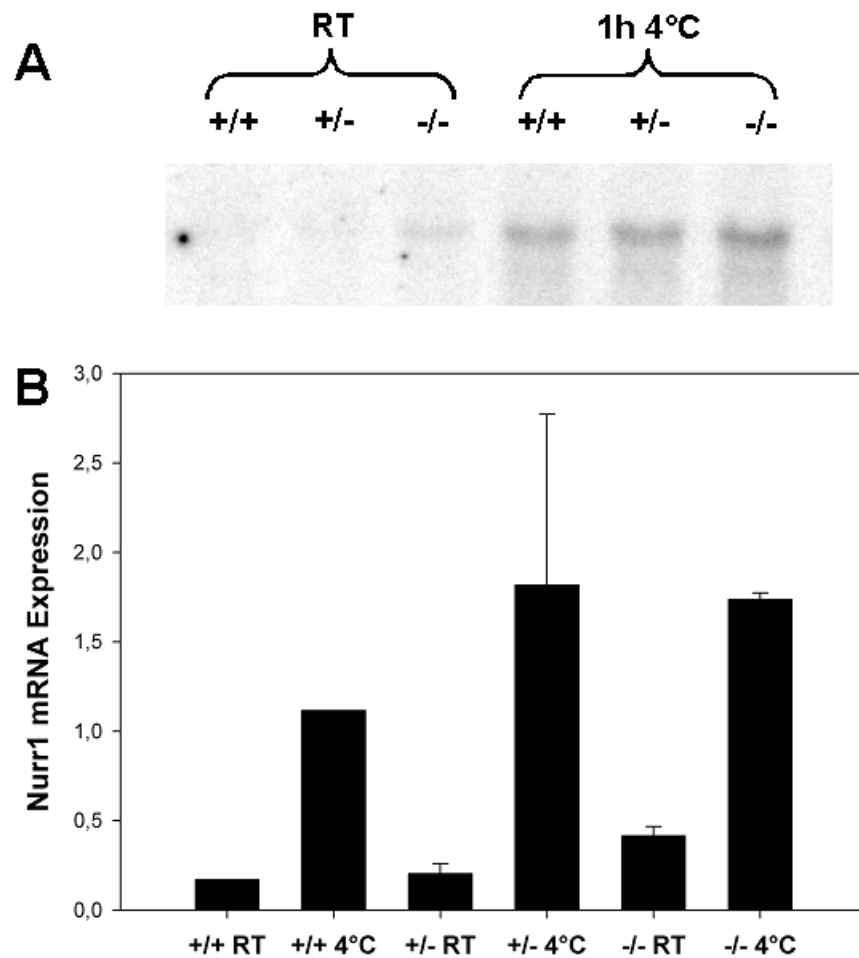


Abbildung 21: A: Northernblot-Analyse der Nurr1 Expression im interscapularen BAT von Nur77KO Mäusen B: Densitometrische Quantifizierung. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung in dimensionslosen densitometrischen Einheiten (WT: Wildtyp (n=1), HT: Heterozygot (n=4), KO: Knockout (n=4); RT: Raumtemperatur, 4°C: 1h bei 4°C)

3.10 Vergleich verschiedener Nur77 Antikörper

Die Auswahl an kommerziell erhältlichen Antikörpern zur Detektion von Nur77 ist sehr gering. Versuche mit einem Antikörper von Santa Cruz Nur77 zu detektieren, scheiterten völlig. Der Antikörper war nicht einmal in der Lage das eigens angeforderte Peptid zu erkennen, das zur Herstellung des Antikörpers verwendet wurde.

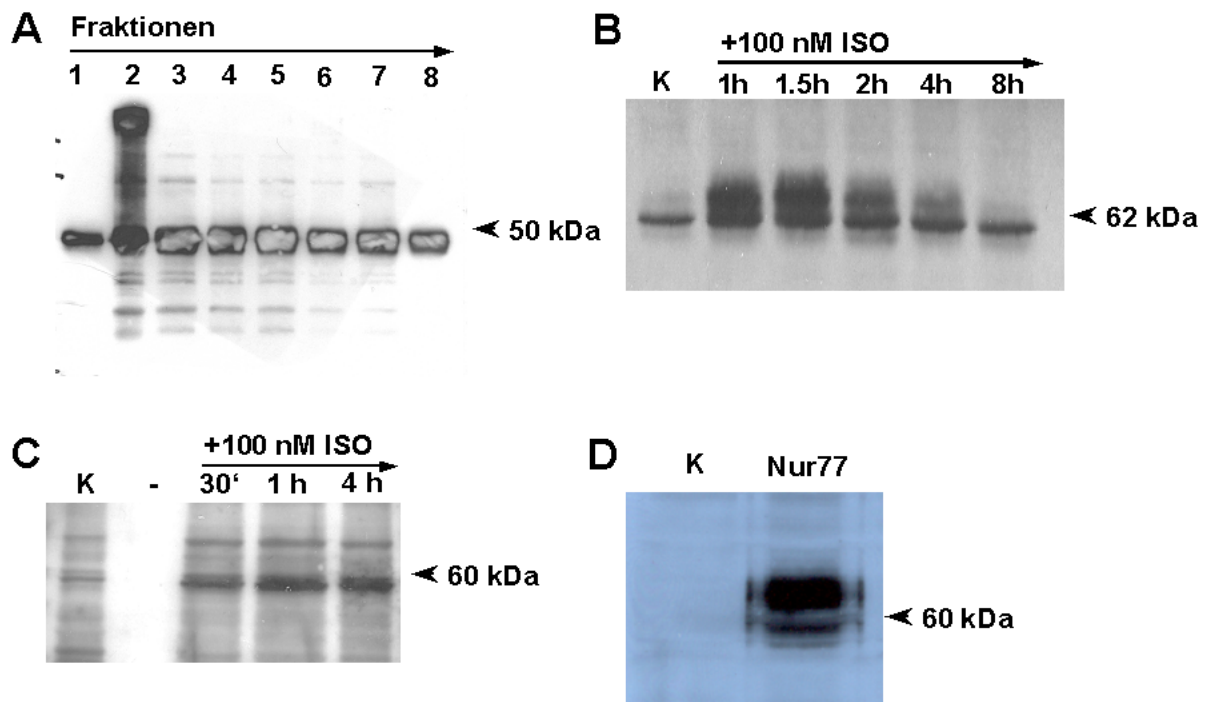


Abbildung 22: Vergleich unterschiedlicher Nur77-Antikörper in der Westernblot-Analyse
A: Bestimmung des Antikörpergehaltes in den einzelnen Eluat-Fractionen nach Aufreinigung durch Affinitätschromatographie **B:** Kernextrakte β -adrenerg stimulierter HIB1B-Zellen detektiert mit einem monoklonalen Antikörper (2E1.1 von J. Milbrandt). **C:** Kernextrakte β -adrenerg stimulierter HIB1B-Zellen detektiert mit einem selbst hergestellten Nur77-Antikörper (Blot von F. Bolze); **D:** Zelllysate von Nur77 transfizierten HEK293-Zellen. Detektion mit monoklonalem Nur77-Antikörper von BD Biosciences (Blot von F. Bolze)

Ein nicht kommerzieller monoklonaler Nur77-Antikörper aus dem Labor von Professor Milbrandt lieferte dagegen exzellente Ergebnisse sowohl in der Westernblot-Analyse (Abbildung 22B) als auch in immuncytochemischen Untersuchungen. Leider stand dieser Antikörper nicht mehr zur Verfügung und konnte auch nicht mehr beschafft werden. Daher sollten Antikörper gegen Nur77 und Nor1 (keine kommerziellen Antikörper erhältlich) hergestellt werden.

In Zusammenarbeit mit der Firma BioSciences wurden geeignete Peptidsequenzen ermittelt, die keine Kreuzreaktionen innerhalb der gut konservierten Nr4a-Familie zeigen. Nach der Synthese der Peptide wurden diese mit KLH gekoppelt, um die Immunogenität zu erhöhen. Sowohl die Synthese und Kopplung der Peptide als auch die Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma BioSciences durchgeführt.

Um aus dem Serum spezifisch die Nur77 bzw. Nor1 Antikörper zu isolieren, wurden die zur Immunisierung eingesetzten Peptide an eine Sepharose-Matrix gekoppelt. Mit

dieser Gelmatrix war es möglich die Nur77 bzw. Nor1 Antikörper aus dem Serum aufzureinigen. Das in acht Fraktionen aufgefangene Eluat aus der Affinitätsaufreinigung wurde in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach Inkubation mit einem HRP-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper konnte der Gehalt an Antikörpern in den einzelnen Fraktionen abgeschätzt werden. Bei etwa 50 kDa sind die schweren Ketten der Antikörper zu erkennen (Abbildung 22A). Die Fraktionen 3 bis 8 wurde daraufhin zusammengeführt und in der Westernblotanalyse eingesetzt.

Der selbsthergestellte Nur77 Antikörper war zwar in der Lage in Kernextrakten von β -adrenerg stimulierten HIB1B-Zellen Nur77 zu detektieren, jedoch wurden auf den Blots auch zahlreiche unspezifische Banden detektiert (Abbildung 22C).

Da trotz umfangreicher Bemühungen dieses Problem nicht beseitigt werden konnte, wurde ein monoklonaler Nur77-Antikörper der Firma BD Biosciences getestet. Dieser Antikörper detektierte Nur77 in der Westernblot-Analyse problemlos und lieferte Ergebnisse, die vergleichbar mit dem von Professor Milbrandt zur Verfügung gestellten Antikörper waren (Abbildung 22D). Aus diesem Grunde wurde der monoklonale Antikörper von BD Biosciences sowohl in den Westernblot-Analysen von F. Bolze als auch in den von mir durchgeführten ChIP-Assays eingesetzt.

4 Diskussion

Man unterscheidet bei Säugetieren zwei Arten von Fettgewebe. Das weiße Fett (WAT), das hauptsächlich der Speicherung von Energie in Form von Triglyceriden dient und das braune Fettgewebe (BAT), welches der Hauptort der zitterfreien Wärmebildung (NST) ist.

Eine Aktivierung der NST wird über die dichte sympathische Innervierung des BAT vermittelt. Die durch β -adrenerge Stimulation in braunen Adipozyten ausgelösten Vorgänge können in akute und chronische Effekte eingeteilt werden (Lowell et al. 2000).

Akute Auswirkungen sind eine Steigerung der Lipolyse, die Aktivierung von UCP1 durch freie Fettsäuren und damit verbundener Wärmeproduktion. Diese Effekte sind bereits nach einer Minute deutlich zu beobachten. Es kommt jedoch bei einer Stimulationsdauer von über 2 Stunden auch zu einer Erweiterung der Thermogenesekapazität (Heldmaier. 1974).

Die Erhöhung der Thermogenesekapazität wird bewirkt durch eine Steigerung der UCP1-Expression, verstärkte mitochondriale Biogenese, Hyperplasie des BAT und Rekrutierung brauner Adipozyten in WAT Depots.

Zur Identifikation von Genen, die an der Kälteanpassung im BAT beteiligt sind, wurden die mRNA-Populationen von β -adrenerg stimulierten mit nicht stimulierten braunen Adipozyten mittels *representational difference analysis* verglichen und die Differenzprodukte kloniert (Klingenspor, unveröffentlichte Ergebnisse).

Eines dieser β -adrenerg induzierten Differenzprodukte war der Waisenrezeptor Nur77. Erste Experimente bestätigten eine starke Induktion der Nur77-Expression nach β -adrenerger Stimulation in braunen aber nicht in weißen Adipozyten (Kanzleiter et al. in Vorbereitung).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktion der Waisenrezeptor Nur77 im braunem Fettgewebe ausübt. Der Schwerpunkt der durchgeführten Untersuchungen war eine mögliche Funktion von Nur77 im Kontext der Thermogenese aufzuzeigen. Es wurden Bereiche wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose untersucht, die ebenfalls Einfluss auf die Thermogenesekapazität haben.

4.1 Mechanismen der Nur77 Induktion im braunen Fettgewebe

Die Induktion von Nur77mRNA in HIB1B-Zellen durch β -adrenerge Stimulation erfolgt sehr rasch. Bereits nach 20 Minuten Stimulationsdauer ist Nur77 zu detektieren und erreicht nach einer Stunde das Maximum. Die Expression ist transient und nach zwei Stunden bereits kaum noch zu detektieren (Kanzleiter et al. In Vorbereitung).

4.1.1 Beta-adrenerge und Oleat vermittelte Induktion von Nur77

Beta-adrenerge Stimulation brauner Adipozyten führt über die Aktivierung des G-Protein gekoppelten β 3-adrenergen Rezeptors zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, die wiederum zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels führt. Die dadurch aktivierte Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB oder Enzyme wie die Hormon-sensitive Lipase (HSL). Aktivierung von CREB im BAT führt zur gesteigerten Transkription verschiedener Gene wie z.B. PGC-1, während die Phosphorylierung der HSL zur Freisetzung von freien Fettsäuren (FFA) aus Triglyceriden führt (Abbildung 23; (Lowell et al. 2000).

Um zu klären, ob die nach β -adrenerger Stimulation beobachtete Induktion von Nur77 in braunen Adipozyten direkt durch PKA phosphorylierte Transkriptionsfaktoren oder über den Umweg der freigesetzten Fettsäuren vermittelt wird (Abbildung 23), wurden braune Adipozyten mit der Fettsäure Oleat stimuliert.

Die nach einer Stunde Stimulation mit Oleat zu beobachtende Induktion von Nur77 ist deutlich geringer als diejenige, welche nach β -adrenerger Stimulation der gleichen Dauer zu beobachten ist. Interessanterweise fällt die Menge an detektierbarer Nur77mRNA nach 2h Stunden nicht wieder auf den basalen Level der Kontrolle zurück, sondern verschwindet völlig.

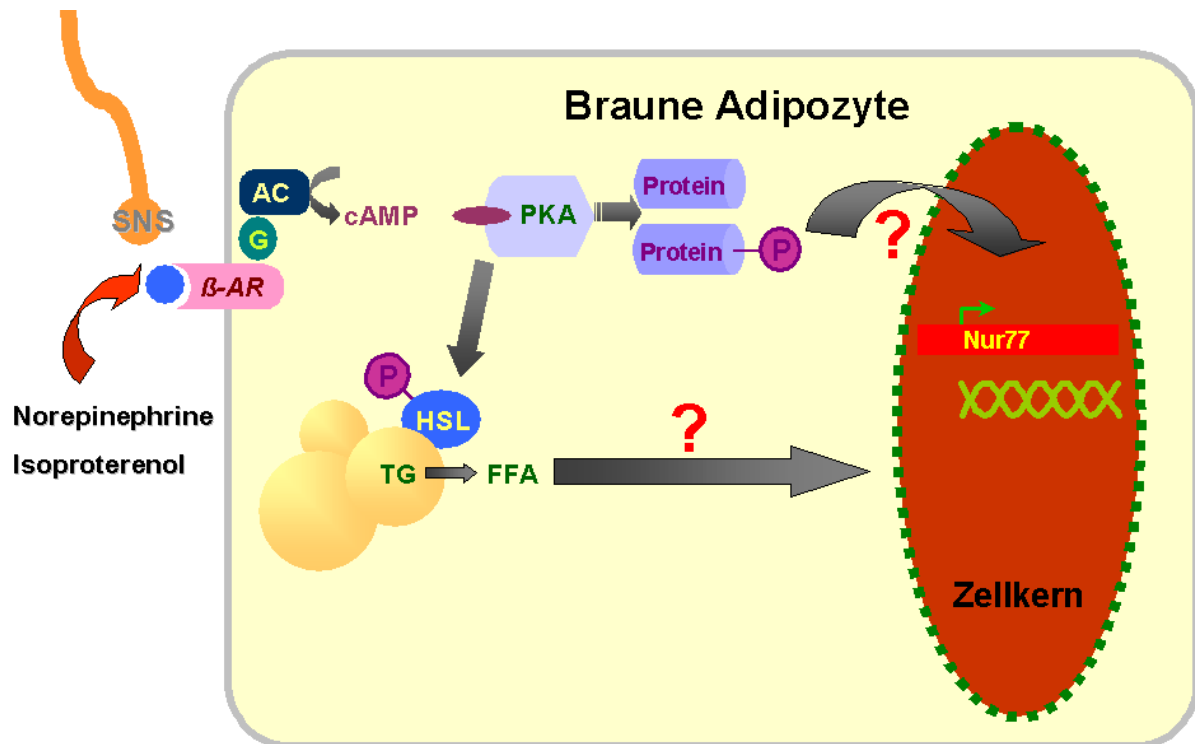


Abbildung 23: Beta-adrenerge Induktion von Nur77 in braunen Adipozyten

Die in pankreatischen β-Zellen zu beobachtende Induktion von Nur77 nach Stimulation mit Oleat wird von den Autoren auf Proteinkinase C (PKC) und Calcium abhängige Mechanismen zurückgeführt, die durch freie Fettsäuren aktiviert werden können (Roche et al. 1999). Sowohl die Reduktion der verfügbaren PKC-Menge als auch die Hemmung der Calcium-Kanäle durch Nifedipine führte zu einer Hemmung der Nur77-Induktion nach Stimulation mit Oleat. Die hier beobachtete Oleat vermittelte Nur77-Induktion könnte ebenfalls auf diese Mechanismen zurückzuführen sein.

Eine Erklärung für die eher geringe Zunahme der Nur77-Expression nach Stimulation mit Oleat in braunen Adipozyten, könnte eine zu geringe Konzentration sein. Die zur Stimulation eingesetzte Konzentration von 0,5 mM Oleat führte jedoch in pankreatischen β-Zellen zu einer sehr deutlichen Induktion von Nur77 (12fach). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die geringe Induktion in braunen Adipozyten (2,5fach) bei einer Erhöhung der Oleat Konzentration das Niveau erreicht, welches nach β-adrenerger Stimulation zu beobachten ist.

Ein generelles Problem in der Interpretation dieses Experimentes ist die relativ schwache Signalstärke, da in HIB1B-Zellen stets eine nur sehr geringe Menge Nur77-mRNA vorhanden ist. Deshalb ist es schwierig zu unterscheiden, ob es sich bei der in der Kontrollbehandlung detektierten RNA um den basalen Expressionslevel handelt oder ob es aus unbekannten Gründen zu einer Nur77-Induktion in den unbehandelten Zellen kam. Unerwartet ist allerdings, dass nach längerer Stimulationsdauer die RNA-Expression unter das Detektionslimit abfällt.

Das Experiment wurde zwar mit je zwei Zellkulturschalen pro Behandlung durchgeführt, es handelte sich dabei jedoch nicht um eine unabhängige Wiederholung. Das Medium für beide Ansätze wurde gemeinsam angesetzt, so dass eine eventuelle Kontamination beide Ansätze in gleicher Weise betroffen hätte. Eine erneute Durchführung des Experimentes scheint daher sinnvoll, um auszuschließen, dass die in der Kontrollbehandlung beobachtete Nur77mRNA-Induktion nicht auf einem Artefakt beruht.

Eine längere Stimulationsdauer mit Oleat könnte darüber hinaus die Frage klären ob es wirklich zu einer Absenkung der basalen Nur77 Transkription nach zwei bis vier Stunden kommt. Nach längerer Stimulation müsste dann wieder eine basale Nur77-Expression zu beobachten sein.

Da die Nur77-Induktion nach Oleat Behandlung deutlich geringer ausfällt als nach β -adrenerger Stimulation, kann davon ausgegangen werden, dass die β -adrenerge Induktion von Nur77 direkt über PKA aktivierte Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Abbildung 23).

4.2 Nur77 während der Differenzierung von Adipozyten

Eine Möglichkeit die Thermogenesekapazität zu erhöhen besteht darin, die Anzahl der thermogeneserelevanten Zellen zu erhöhen. In der Tat führt β -adrenerge Stimulation sowohl zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung von braunen Präadipozyten als auch zu einer Rekrutierung von braunen Adipozyten in WAT-Depots (Geloën et al. 1988; Ghorbani et al. 1997; Nedergaard et al. 1995).

Nur77 wird in verschiedenen Arbeiten im Kontext mit Proliferation und Differenzierung erwähnt (Jimenez-Cervantes et al. 1998; Pichon et al. 1996; Wu et al. 2002; Yang et al. 1997). Daher wurde die Expression von Nur77 während der Proliferation und Differenzierung von braunen Präadipozyten (HIB1B) untersucht.

In HIB1B-Zellen konnte eine konstitutive Nur77-Expression während der Proliferation von Präadipozyten detektiert werden. Sobald die Zellen ein Stadium der Konfluenz erreichten (Tag 4), konnte Nur77 nicht mehr detektiert werden. Da am vierten Tag der Kultur auch die Zusammensetzung des Zellkulturmediums verändert wird (Reduktion des FCS-Gehaltes von 10% auf 7%, Zugabe von 17 nM Insulin), wurden die Zellen in einem separaten Experiment ohne Veränderung des Zellkulturmediums am vierten Tag kultiviert. Es konnte auch unter diesen Bedingungen keine Nur77-mRNA mehr nach dem dritten Tag detektiert werden. Ein Einfluss dieser Parameter auf die Nur77-Expression kann daher ausgeschlossen werden.

In weißen Adipozyten (3T3L1) konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die Expression von Nur77 detektiert werden. Damit konnte auch für die Induktion von Nur77 während der Proliferation die BAT spezifische Expression bestätigt werden.

Die bekannten an der Adipozytendifferenzierung beteiligten Faktoren (PPAR γ , ADD1, RXR α , PGC-1, C/EBP α , β und δ) werden mit Ausnahme von PGC-1 sowohl im BAT als auch im WAT exprimiert (Rosen et al. 2000). Daher ist die BAT-spezifische Expression von Nur77 während der frühen Stadien der Differenzierung von besonderem Interesse.

Ein Einfluss von Nur77 auf die Kontrolle des Zellzyklus ist aus Magenkrebszellen bekannt. Dort wird der Zellzyklus durch all-trans-retinonsäure arretiert, wenn Nur77 im Zellkern vorhanden ist (Wu et al. 2002).

In braunen Präadipozyten scheint es jedoch eine andere Funktion zu übernehmen, da es nur während der Proliferationsphase zu einer Nur77-Expression kommt.

Aus Arbeiten an der Skelettmuskelzelllinie C2C12 ist bekannt dass Nur77 während der Proliferationsphase der Zellen konstitutiv exprimiert wird (Yang et al. 1997). Im Gegensatz zur in dieser Arbeit beschriebenen Abnahme der Nur77 Expression beim Eintritt in die Differenzierung, steigt die Expression in C2C12 Zellen bei Beginn der Differenzierung um den Faktor 4-5 an (Yang et al. 1997). Ein molekularer Mechanismus der Nur77-Funktion ist jedoch auch hier unbekannt.

Die auf die Proliferationsphase beschränkte Expression von Nur77 lässt vermuten, dass Nur77 im braunen Fettgewebe entweder an der Steuerung des Zellwachstums beteiligt ist oder als Inhibitor der Differenzierung wirkt.

4.3 Aktivierung der *response elements* in HIB1B

Nur77 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an bestimmte DNA-Abschnitte die Genregulation direkt beeinflussen kann, aber auch in der Lage ist, durch Export aus dem Zellkern Effekte wie Apoptose auszulösen. Diese unterschiedlichen Wirkmechanismen von Nur77 werden durch posttranslationale Modifikation gesteuert.

Westernblot-Analysen in β -adrenerg stimulierten braunen Adipozyten zeigten eine deutliche Massenzunahme von Nur77, die auf eine posttranslationale Modifikation schließen lässt (Abbildung 25). Ein anfänglicher Verdacht, dass es sich hierbei um eine Sumoylierung handeln könnte, wurde in der Diplomarbeit von F. Bolze (2004) widerlegt.

Daher wurde in Reportergenstudien mit zwei bekannten, durch Nur77 aktivierbaren *response elements* (NBRE und NurRE) überprüft, ob Nur77 in der Lage ist, diese in braunen Adipozyten zu aktivieren.

Nur77 kann drei verschiedene *response elements* aktivieren. Das NBRE (*NGFIB binding response element*) als Monomer, das NurRE (*nur77 response element*) als Homodimer und ein RARE (*retinoic acid response element*) als Heterodimer mit RXR α . Wenn Nur77 in HIB1B-Zellen an der transkriptionellen Regulation bestimmter Gene beteiligt ist, würde man eine Aktivierung dieser *response elements* erwarten. Durch Transfektion von HIB1B-Zellen mit Reportergenkonstrukten, welche das NBRE bzw. NurRE enthielten, sollte dies überprüft werden.

Nach 90minütiger β -adrenerger Stimulation der Zellen wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Sowohl das NBRE- als auch das NurRE-Reportergenkonstrukt zeigten eine leichte Aktivierung nach β -adrenerger Stimulation. Die verhältnismäßig schwache Aktivierung, ist vermutlich auf zu geringe Nur77 Proteinmengen zurückzuführen. Diese Vermutung wurde durch Überexpression von Nur77 in HIB1B-Zellen bestätigt, da diese zu einer deutlich stärkeren Aktivierung von NBRE- und NurRE-Reportergenkonstrukten führt.

Ein weiteres Problem könnte sich durch die Dauer der β -adrenergen Stimulation ergeben. Nach 60 Minuten sind zwar bereits die höchsten Mengen an Nur77 Protein zu beobachten, jedoch muss auch die Zeit berücksichtigt werden, die für die Expression der Luciferase nötig ist. Eine Wiederholung des Versuches mit längerer Stimulationsdauer erscheint daher sinnvoll.

Interessanterweise konnte jedoch die schwache Aktivierung sowohl des NBRE als auch des NurRE durch die Zugabe von Cyclosporin A völlig gehemmt werden. Aus Arbeiten an T-Zellen ist bereits bekannt das Cyclosporin A in der Lage ist die DNA-Bindung von Nur77 zu unterbinden und damit die apoptotische Wirkung zu verhindern (Yazdanbakhsh et al. 1995). Da die Hemmung der DNA-Bindung von Nur77 durch Cyclosporin A auch in braunen Adipozyten stattfindet, ergibt sich eine einfache Möglichkeit zur transkriptionellen Inaktivierung von Nur77. Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob Cyclosporin A auch die DNA-Bindung der beiden anderen Nr4a-Familienmitglieder verhindern kann, die funktionelle Redundanz zu Nur77 zeigen (Cheng et al. 1997; Zetterstrom et al. 1996). Es ist jedoch wahrscheinlich das zumindest auch Nor1 die Fähigkeit zur DNA-Bindung verliert. Wenn ausschließlich Nur77 inaktiviert werden würde, wäre in T-Zellen keine Hemmung der Apoptose durch Cyclosporin A zu erwarten, da Nor1 kompensatorisch wirkt (Cheng et al. 1997). Eine Überprüfung, ob Cyclosporin A tatsächlich die DNA-Bindung aller Nr4a-Familienmitglieder verhindert, sollte unbedingt durchgeführt werden. Falls Cyclosporin A tatsächlich die transkriptionelle Inaktivierung aller drei Familienmitglieder bewirkt, würde sich ein sehr einfacher Weg eröffnen, um in HIB1B-Zellen die Konsequenzen eines Nur77 „Knockout“ ohne Kompensation durch Nor1 oder Nurr1 zu untersuchen.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Aktivierung der beiden *response elements* NBRE und NurRE in braunen Adipozyten kann mit diesem Experiment keine eindeutige Aussage über die Rolle von Nur77 bei der Regulation der Genexpression in braunen Adipozyten gemacht werden. Der nach Cyclosporin A Behandlung beobachtete Rückgang in der NBRE und NurRE Aktivität legt jedoch eine transkriptionelle Aktivität von Nur77 in braunen Adipozyten nahe.

Um eine exaktere Aussage machen zu können, sollte das Experiment mit längerer Stimulationsdauer wiederholt werden. Die Einbeziehung eines Nur77 responsiven RARE in die Messungen wäre ebenfalls von Vorteil.

4.4 Regulatorischer Effekt von Nur77 auf das UCP1-Gen

Von der etwa 2,5kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegenden UCP1-Enhancer Region ist bekannt, dass viele verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. PPAR γ und RXR α binden können. Die Enhancer-Region allein ist ausreichend für die Gewebespezifität und β -adrenerge Induzierbarkeit von UCP1 (Silva et al. 1997).

Eine mögliche Funktion für Nur77 im braunen Fettgewebe wäre die Regulation der UCP1-Expression, da beide Gene β -adrenerg kontrolliert und zeitlich versetzt exprimiert werden (Abbildung 25).

Um eine mögliche Regulation der UCP1-Expression durch Nur77 zu untersuchen, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Christoph Eickhorst ein Reportergenkonstrukt unter der Kontrolle des UCP1-Enhancers konstruiert.

4.4.1 Reportergenassays mit dem UCP1-Enhancer

Die Reportergenassays mit dem UCP1-Enhancer wurden aus zwei Gründen in HEK293-Zellen durchgeführt. Zum einen, da in diesen Zellen kein endogenes Nur77 vorhanden ist, das mit dem Reporterkonstrukt interagieren könnte, zum anderen sind die Transfektionen in HEK293-Zellen deutlich einfacher durchzuführen als in HIB1B-Zellen.

Die Aktivierung des UCP1-Enhancers durch PPAR γ /RXR α -Heterodimere ist bereits bekannt, daher wurden diese Faktoren in dem Experiment eingesetzt, um die Funktionalität des Reportergenkonstruktes zu überprüfen. Der Einfluss von Nur77 auf den UCP1-Enhancer in einer beliebigen Kombination mit PPAR γ und RXR α sollte in diesem Experiment überprüft werden.

Kotransfektion des Reportergenkonstruktes mit Nur77, PPAR γ oder RXR α führte zu keiner Aktivierung im Vergleich zur basalen Aktivität. Bei gemeinsamer Transfektion von PPAR γ und RXR α , kam es wie erwartet zu einer deutlichen Aktivierung des Reportergenkonstruktes (4,5fach). Diese konnte durch Nur77 jedoch teilweise inhibiert werden (2,4fach).

Es sind mehrere Möglichkeiten zur Erklärung dieser Repression durch Nur77 denkbar.

1: Eine Heterodimerbildung zwischen Nur77 und RXR α ist aus verschiedenen Arbeiten bekannt (Cao et al. 2004; Perlmann et al. 1995). Die Bildung eines Nur77/

RXR α -Heterodimers würde zu einer Kompetition zwischen Nur77 und PPAR γ um den Heterodimerpartner RXR α führen. Der PPAR γ /RXR α -Heterodimer ist aber zur Aktivierung des UCP1-Enhancers notwendig und eine Abnahme des verfügbaren RXR α würde somit in einer verminderten Aktivierung des UCP1-Enhancers resultieren.

2: Eine andere denkbare Möglichkeit ist eine direkte Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer und eine daraus resultierende Inaktivierung. Eine Analyse der Sequenz des UCP1-Enhancers ergab, dass sich ein *response element* für Nur77 dort befindet. Um zu testen, ob es sich tatsächlich um ein funktionsfähiges NBRE handelt und es somit zu einer Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer kommt, wurde ein ChIP-Experiment durchgeführt.

4.4.2 Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer

Aufgrund der Repression der PPAR γ /RXR α vermittelten Aktivierung des UCP1-Enhancers durch Nur77 in Reporterassays sollte in diesem Experiment die Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer in HIB1B-Zellen überprüft werden.

Um eine Bindung von Nur77 an den UCP1-Enhancer zu prüfen, wurden Chromatinimmunopräzipitationen in HIB1B-Zellen mit einem Nur77 bzw. RXR α Antikörper durchgeführt. Es wurden sowohl unstimulierte, als auch β -adrenerg stimulierte HIB1B-Zellen (1 Stunde) in dem Experiment eingesetzt. Es konnte unter beiden Bedingungen eine Interaktion von Nur77 und RXR α mit dem UCP1-Enhancer gezeigt werden.

Um die Spezifität des Experimentes zu überprüfen wurde mit den gleichen präzipitierten DNA-Fragmenten eine PCR durchgeführt, die einen DNA-Abschnitt 1,5 kb stromaufwärts des UCP1-Enhancers amplifiziert (Abbildung 24, Primerpaar C/D). Nur in den Inputkontrollen konnte dieser DNA-Abschnitt amplifiziert werden, das die Spezifität des Experimentes untermauert.

Auch in nicht differenzierten HIB1B-Zellen konnte eine Interaktion von Nur77 bzw. RXR α mit dem UCP1-Enhancer unter allen getesteten Bedingungen nachgewiesen werden.

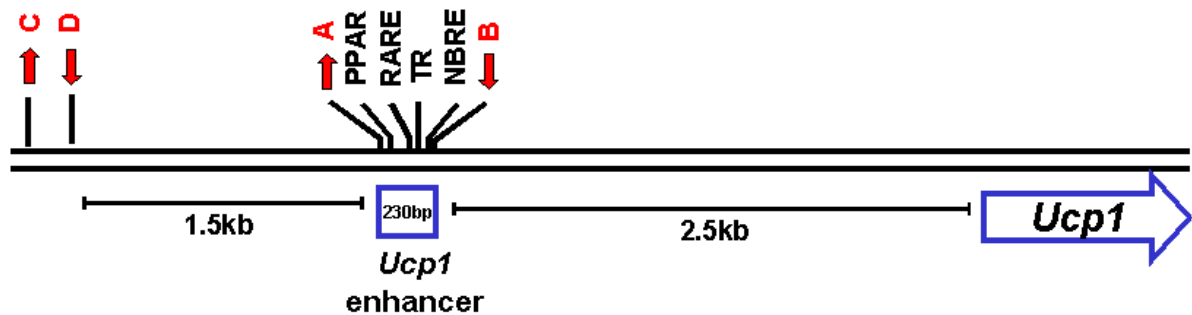


Abbildung 24: Schematische Darstellung des UCP1-Enhancers. A und B kennzeichnen die Bindestellen der Primer, die für die Amplifikation des UCP1-Enhancers aus den Chromatin-Immunopräzipitaten verwendet wurden. C und D geben die Lage der für den Spezifitätsnachweis verwendeten Primer an. Die in der Enhancer Region eingezeichneten Bindestellen für PPAR γ , TR und RA wurden bereits identifiziert (Silva et al. 1997). Das eingezeichnete Nur77-DNA-Bindemotiv (NBRE) wurde aufgrund seiner Sequenz identifiziert.

Durch Analyse der Sequenz des UCP1-Enhancers konnte das Motiv eines möglichen *response elements* für Nur77 (NBRE) identifiziert werden. Da weder die Sequenz eines Nur77 responsiven RAREs, noch eines NurRE gefunden werden konnte, ist eine Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer über das NBRE anzunehmen.

Das im UCP1-Enhancer beschriebene RARE (Rabelo et al. 1996) weicht deutlich von der Sequenz ab, die für durch Nur77/RXR-Heterodimere aktivierbare RAREs beschrieben wurde (Perlmann et al. 1995). Eine Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer über dieses *response element* ist daher eher unwahrscheinlich.

Leider ist mit dem vorliegenden Versuchsaufbau keine quantitative Aussage möglich, so dass der Einfluss von β -adrenerger Stimulation auf die Quantität der Interaktion von Nur77 bzw. RXR α mit dem UCP1-Enhancer nicht untersucht werden konnte.

4.4.3 Einfluss der Nur77 Überexpression auf UCP1 in HIB1B-Zellen

Um die Hypothese, dass Nur77 ein negativer Regulator der UCP1-Expression ist, weiter zu untersuchen wurde in HIB1B-Zellen Nur77 überexprimiert. Wenn Nur77 tatsächlich die UCP1-Expression reprimiert, sollte bei Überexpression von Nur77 ein Einfluss auf die UCP1-Expression zu beobachten sein.

Mittels Nucleofektion wurden HIB1B-Zellen mit Nur77 tragendem bzw. leerem Expressions-Vektor transfiziert und 24 Stunden später für vier Stunden mit Isoproterenol stimuliert. Die Expression von UCP1 wurde mittels Northernblot-Analyse überprüft.

In nicht transfizierten β -adrenerg stimulierten Zellen konnte erwartungsgemäß eine starke Induktion der UCP1-Expression detektiert werden. Nur77-transfizierte HIB1B-Zellen zeigten nur eine sehr schwache UCP1-Expression. Da jedoch die Transfektion mit leerem Vektor ebenfalls zu einer sehr geringen UCP1-Expression führte, kann leider keine Aussage über den Einfluss von Nur77 auf die UCP1-Expression gemacht werden. Die Transfektion selbst schien bereits einen deutlichen Einfluss auf die Expression zu haben.

Das zur Transfektion gewählte Verfahren der Nucleofektion stellt im wesentlichen eine modifizierte Elektroporationsmethode dar. Eine mögliche Ursache für die Beeinflussung der UCP1-Expression durch die Methode an sich könnte sein, dass Nur77 durch Membrandepolarisation induziert wird (Hazel et al. 1991). Um zu überprüfen, ob dieser aus PC12-Zellen bekannte Befund auch in braunen Adipozyten zutrifft, wurde die Nur77 Expression in den gleichen Proben untersucht.

Die mit einem Nur77-Expressionsvektor transfizierten Zellen zeigten erwartungsgemäß eine starke Nur77-Expression. Die mit einem leerem Expressionsvektor transfizierten Zellen zeigten jedoch eine im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen nur geringfügig erhöhte Nur77-Expression. Trotzdem ist nicht auszuschließen das es zu einer Induktion von Nur77 durch die Transfektion kam, da zwischen der Nucleofektion und dem Experiment ein Zeitraum von 24 Stunden lag.

Die Transfektion scheint also nicht zu einer generellen Beeinflussung der Genexpression geführt zu haben sondern nur bestimmte Gene zu betreffen, soweit diese Frage mit der Detektion von nur zwei Genen beantwortet werden kann.

Eine weitere mögliche Ursache für den Einfluss der Transfektion auf die UCP1-Expression könnte in den Puffern liegen, die zur Nucleofektion eingesetzt werden. Bei der Nucleofektion werden die Zellen in einem Puffer aufgenommen, der isotonisch zum inneren Milieu der Zelle sein soll, um bei der Poration der Zellmembran durch Elektroimpulse die Vitalität der Zelle nicht zu gefährden. Da aber der Hersteller nicht preisgibt, was sich in den Puffern befindet, kann ein Einfluss auf die Genregulation der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Trotz der für HIB1B-

Zellen erfreulich hohen Transfektionseffizienz ist das Verfahren der Nucleofektion für die hier bearbeitete Fragestellung ungeeignet.

Es war daher unmöglich, zwischen der durch die Transfektion verursachten UCP1-Repression und einem eventuellen Einfluss von Nur77 zu unterscheiden. Das Experiment konnte daher keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn in Bezug auf eine mögliche Beeinflussung der UCP1-Expression durch Nur77 erbringen.

4.5 Einfluss von Nur77 auf die Apoptoserate in braunen Adipozyten

Eine Regulation der Apoptoserate in thermogeneserelevanten Zellen wie dem braunen Fettgewebe hat natürlich auch einen Einfluss auf die Thermogenesekapazität eines Organismus. Ein Absenken der Apoptoserate im BAT, wie bei β -adrenerger Stimulation zu beobachten (Lindquist et al. 1998), führt zu einer größeren Anzahl für die Thermogenese zur Verfügung stehenden Zellen und damit zu einer Erhöhung der Thermogenesekapazität. Daher wurde ein möglicher Einfluss von Nur77 auf die Apoptoserate im BAT untersucht.

Am besten charakterisiert ist die proapoptotische Funktion von Nur77 in T-Zellen. Translokation von Nur77 aus dem Zellkern zu den Mitochondrien führt dort zur Freisetzung von Cytochrom C. Dies wiederum führt zur Aktivierung der Caspase 9 und damit der gesamten Caspase-Kaskade (Raff. 1998; Woronicz et al. 1994).

Um zu überprüfen ob Nur77 ebenso wie in T-Zellen als proapoptotischer Faktor wirkt, wurde die Caspase 9-Aktivität in HIB1B-Zellen nach β -adrenerger Stimulation unterschiedlicher Dauer bzw. nach Transfektion mit Nur77 gemessen. In β -adrenerg stimulierten HIB1B-Zellen konnte kein Unterschied in der Caspase 9 Aktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen entdeckt werden. In Nur77 transfizierten Zellen war jedoch nach 24 Stunden die Apoptoserate im Vergleich zu mit einem leeren Expressionsvektor transfizierten Zellen etwas niedriger. Da der beobachtete Effekt jedoch sehr gering war, ist ein Einfluss von Nur77 auf die Apoptoserate in braunen Fettzellen über den Weg der Caspase 9-Aktivierung eher unwahrscheinlich.

Nur77 kann jedoch nicht nur wie in T-Zellen als proapoptotischer Faktor agieren, sondern auch antiapoptotisch wirken. Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF- α) agiert in

vielen Geweben - u.a. BAT (Nisoli et al. 2000) - als proapoptotischer Faktor. TNF- α vermittelte Apoptose kann aber durch Nur77 verhindert werden (Suzuki et al. 2003).

Da die Apoptoserate im BAT nach β -adrenerger Stimulation stark vermindert ist (Lindquist et al. 1998), würde eine Hemmung der TNF- α induzierten Apoptose durch Nur77 im BAT eine plausible Erklärung abgeben.

In weißen Adipozyten wird bei adipösen Mäusen und Raten TNF- α exprimiert (Hotamisligil et al. 1993). Es gibt jedoch keine Untersuchungen über die Expression von TNF- α in braunen Adipozyten.

Daher war der hier beschriebene Versuch vermutlich nur dazu geeignet durch Nur77 direkt induzierte Apoptose zu messen. Um eine Wirkung von Nur77 als antiapoptotischen Gegenspieler von TNF- α zu testen, hätten die Zellen mit TNF- α stimuliert werden müssen.

4.6 Expression von Nurr1 und Nor1 im BAT von Nur77-KO Mäusen

Ein generelles Problem, das bei der Untersuchung der Funktion von Nur77 auftritt ist die Kompensation durch die beiden Nr4a-Familienmitglieder Nurr1 und Nor1 (Cheng et al. 1997; Zetterstrom et al. 1996). Da in Nur77-KO-Mäusen keinerlei Anzeichen einer Störung der Thermogenesekapazität zu finden war (Walter. 2003), scheint auch im BAT eine Kompensation für fehlendes Nur77 vorzuliegen.

Um zu überprüfen ob Nurr1 und Nor1 auch im BAT von Nur77-KO-Mäusen exprimiert werden, wurde deren Expression nach Kälteexposition untersucht

Im BAT konnte die kälteinduzierte Expression sowohl von Nurr1 als auch Nor1 bei allen drei Genotypen nachgewiesen werden. Es ergaben sich jedoch zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Höhe der kälteinduzierten Expression (Abbildung 21 & Abbildung 20).

Wenn man jedoch die kälteinduzierte Nor1 Expression auf das Expressionsniveau bei Raumtemperatur bezieht, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Abbildung 20 B).

Die kälteinduzierte Expression von Nurr1 und Nor1 und die beobachtete Superinduktion von Nor1 in homozygoten Nur77-KO-Mäusen lässt den Schluss zu, dass auch im BAT eine Kompensation durch Nr4a-Familienmitglieder stattfindet.

Da leider nicht genügend Tiere verfügbar waren, um die Nurr1-Expression in gleicher Art und Weise zu untersuchen, kann für Nurr1 nur bestätigt werden, dass die Expression genau wie bei Nur77 und Nor1 nach Kälteexposition im BAT induziert wird. Ob auch hier eine Genotyp abhängige Superinduktion stattfindet, bleibt jedoch noch zu untersuchen.

Ihre transkriptionelle Aktivität vermitteln die Nr4a-Familienmitglieder durch drei verschiedene *response elements* (NBRE, NurRE und RARE). Nur77, Nor1 und Nurr1 aktivieren das NBRE als Monomer und das NurRE als Homodimer. Das RARE wird nur von Nur77 oder Nurr1 als Heterodimer mit RXR α aktiviert. Da aber alle drei Faktoren im BAT durch Kälteexposition reguliert werden und keinerlei Unterschiede im Phänotyp zwischen Wildtyp und Nur77-KO-Mäusen zu beobachten sind, liegt eine kompensatorische Funktion nahe, wie sie auch schon in der Apoptose von T-Zellen beschrieben wurde (Cheng et al. 1997).

Eine Möglichkeit, das Problem der Kompensation zu umgehen, wäre die Herstellung einer transgenen Maus, die BAT-spezifisch eine dominant-negative Form von Nur77 exprimiert. Die dominant negative Form von Nur77 ist zwar noch in der Lage an die entsprechenden DNA-Sequenzen zu binden, allerdings kann sie diese nicht mehr aktivieren. Dies verhindert die Kompensation durch Faktoren wie Nor1 und Nurr1, die über die gleichen DNA-Bindestellen wirken. Diese Strategie wurde bereits erfolgreich bei der Untersuchung der Nur77-vermittelten Apoptose in T-Zellen eingesetzt (Kuang et al. 1999). Diese transgenen Mäuse exprimieren ein dominant-negatives Nur77 in T-Zellen was zu einem deutlichen Phänotyp führt. Die Mäuse waren nicht mehr in der Lage autoimmunreaktive T-Zellen zu eliminieren.

4.7 Funktionshypothese von Nur77 im braunen Fettgewebe

Es erwies sich als überaus schwierig eine eindeutige Funktion für Nur77 im braunen Fettgewebe zu definieren. Die kompensatorische Funktion der beiden Nr4a-Familienmitglieder Nurr1 und Nor1 machte es beispielsweise unmöglich durch Untersuchungen an Nur77-KO-Mäusen funktionelle Erkenntnisse zu gewinnen. Die meisten Untersuchungen fanden deshalb an der Zelllinie HIB1B statt. Doch auch dieses Modell hatte Nachteile, da in diesen Zellen sowohl Nor1 als auch Nurr1 β -adrenerg induzierbar waren. Als zusätzliche Schwierigkeit erwies sich die schlechte

Transfizierbarkeit der Zellen bzw. unerwünschte Nebeneffekte der Transfektionsmethode.

4.7.1 Einfluss auf die UCP1-Genregulation

Ein erster Hinweis auf einen möglichen Einfluss von Nur77 auf die UCP1-Genregulation ergibt sich bereits aus dem zeitlichen Muster der β -adrenerg induzierten Expression von Nur77 und UCP1 (Abbildung 25). Die größte Nur77-Proteinmenge konnte nach 1,5 Stunden Stimulation detektiert werden, also etwa zu dem Zeitpunkt, an dem UCP1-mRNA zuerst detektiert werden konnte.

Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen Nur77 und UCP1 lieferten die mit dem UCP1-Enhancer durchgeführten Reporterassays. Experimente zeigten eine Repression der $\text{PPAR}\gamma/\text{RXR}\alpha$ vermittelten Aktivierung des UCP1-Enhancers durch Nur77.

Die Überexpression von Nur77 in HIB1B-Zellen zeigte zwar eine deutliche Inhibition der UCP1-Expression, jedoch war ein gleichartiger Effekt auch in den mit leerem Vektor transfizierten Zellen zu beobachten. Es kann daher keine Aussage über den Effekt einer Nur77-Überexpression auf die UCP1-Regulation gemacht werden, da der Effekt der Transfektion selbst bereits die UCP1-Expression reprimiert.

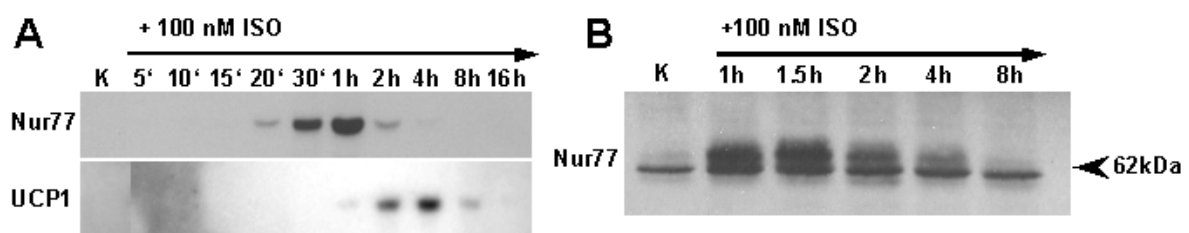


Abbildung 25: Beta-adrenerge Induktion von Nur77 und UCP1 A: Northernblot-Analyse der Nur77 und UCP1 mRNA Induktion durch Isoproterenol in HIB1B-Zellen; B: Westernblot-Analyse der Nur77-Protein Expression nach Stimulation durch Isoproterenol in HIB1B-Zellen

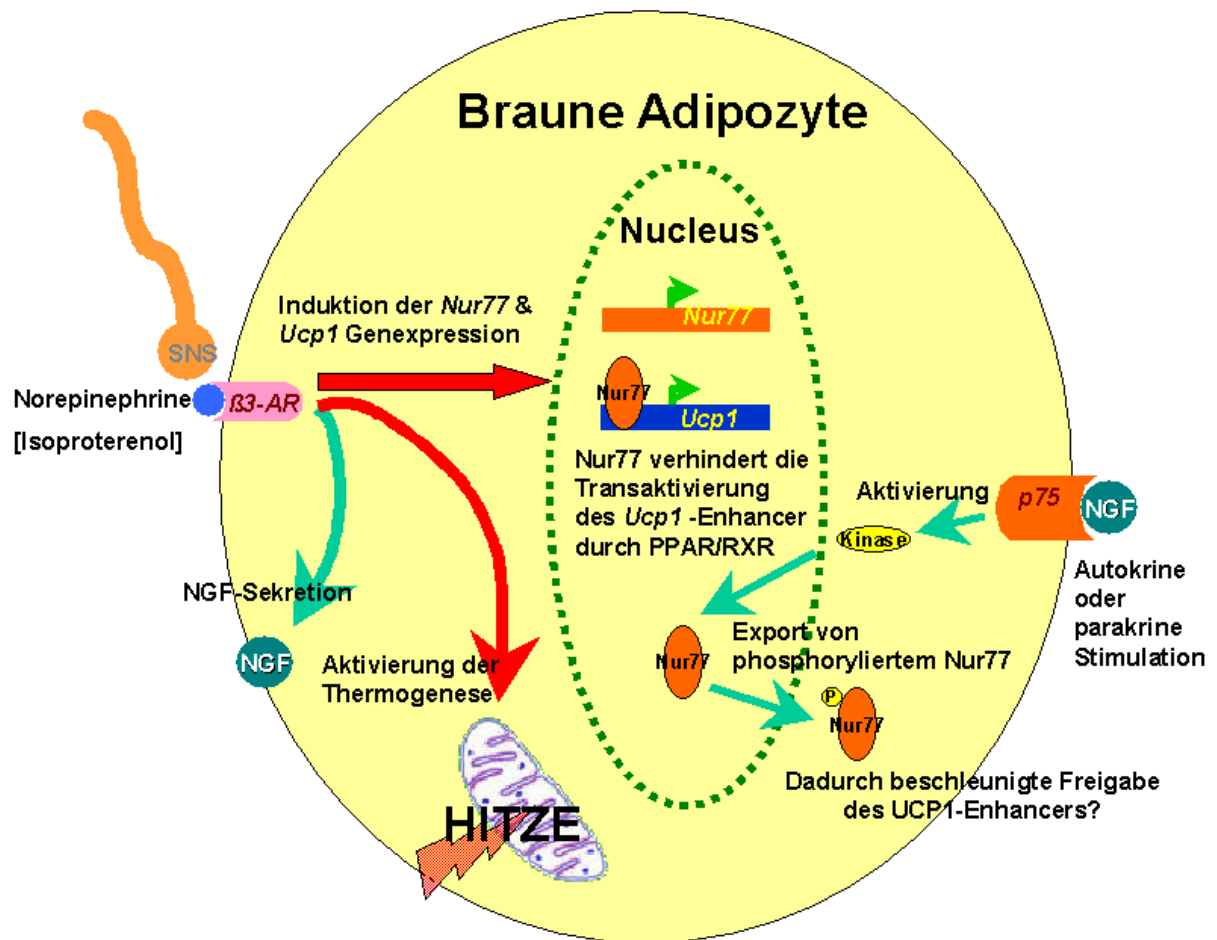


Abbildung 26: Funktionshypothese für Nur77 im braunen Fettgewebe

Die in den ChIP-Experimenten gezeigte Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer weist jedoch deutlich auf eine Verbindung zwischen Nur77 und der Regulation der UCP1-Expression hin.

Eine mögliche Funktion von Nur77 könnte sein, die Expression von UCP1 nach kurzer Kälteexposition zu vermeiden. Diese zunächst paradox anmutende Theorie, dass ein durch Kälte induzierter Faktor als Inhibitor der Kälteanpassung fungiert, ist bei näherer Betrachtung jedoch durchaus plausibel. Es ist für einen Organismus mit nicht unerheblichen energetischen Kosten verbunden, die Thermogenesekapazität zu erhöhen. Das betrifft natürlich nicht nur die Expression von UCP1, sondern auch Anpassungen wie Proliferation des braunen Fettgewebes und gesteigerte Mitochondrienbiogenese.

Daher ist ein Mechanismus sinnvoll, der bei kurzer Kälteexposition zwar die bereits vorhandene Thermogenesekapazität nutzt, jedoch sicher stellt, dass diese nur

gesteigert wird, wenn die Notwendigkeit dazu besteht. Untersuchungen am braunen Fettgewebe von Mäusen und Hamstern zeigen, dass etwa zwei bis zweieinhalb Stunden Kälteexposition nötig sind um eine Steigerung der Thermogenesekapazität zu bewirken (Heldmaier. 1974; Wiesinger et al. 1990).

Die Repression der PPAR γ /RXR α vermittelten Aktivierung des UCP1-Enhancers durch Nur77 würde sicher stellen, dass UCP1 ausschließlich nach β -adrenerger Stimulation von mindestens zwei Stunden Dauer exprimiert wird.

Die durchgeführten ChIP-Experimente zeigten auch in Präadipozyten eine Interaktion von Nur77 mit dem UCP1-Enhancer. Die UCP1-Expression kann in Präadipozyten aber auch nach β -adrenerger Stimulation nicht induziert werden. Andere Faktoren, die notwendig sind zur Induktion der UCP1-Expression, wie PPAR γ und RXR α sind jedoch in Präadipozyten vorhanden, da sie wichtige Faktoren der Adipozytendifferenzierung darstellen. Die konstitutive Expression von Nur77 in Präadipozyten könnte also eine Erklärung für die Blockierung der UCP1-Expression liefern.

Auch eine mögliche antiapoptotische Wirkung von Nur77 in braunen Adipozyten hätte einen Einfluss auf die Thermogenesekapazität. Durch ein Absenken der Apoptoserate im BAT würden mehr Zellen für die Thermogenese zur Verfügung stehen.

Ein möglicher Mechanismus für eine Steuerung der Thermogenesekapazität durch Nur77 ist in Abbildung 26 dargestellt. Die nach Kälteexposition aktivierte sympathische Innervierung (SNS) führt zu einer Ausschüttung von Noradrenalin, das G-Protein gekoppelte, β -adrenerge Rezeptoren aktiviert. Dies führt zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Aktivierung der PKA, die wiederum Transkriptionsfaktoren aktiviert (Lowell et al. 2000) und damit die Nur77-Expression induziert. Zum anderen bewirkt die Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren die Sekretion von bereits in Vesikeln vorhandenem NGF (Nechad et al. 1994; Nisoli et al. 1996).

Transient exprimiertes Nur77 könnte an den UCP1-Enhancer binden und dort die Expression inhibieren. Die Abnahme an Nur77-Protein nach zwei Stunden würde den

UCP1-Enhancer wieder freigeben. Die ohnehin rasche Abnahme an Nur77-Protein im Zellkern könnte zudem durch NGF-induzierten Kernexport beschleunigt werden.

Braune Adipozyten sezernieren NGF nach β -adrenerger Stimulation und verfügen auch über p75-Rezeptoren, die von NGF aktiviert werden können (Nechad et al. 1994; Nisoli et al. 1996).

Außerdem ist bekannt, dass Stimulation mit NGF in braunen Adipozyten nach einer Stunde zu einer Translokation von Nur77 aus dem Kern ins Zytosol führt (Kanzleiter. 2001). Sezerniertes NGF könnte über p75 Rezeptoren zu einer autokrinen bzw. parakrinen Stimulation von braunen Adipozyten führen. Die dadurch aktivierte Kinase (pp90rsk2) phosphoryliert Nur77 am Serin-Rest 105 (Hirata et al. 1995) und bewirkt damit eine Translokation (Katagiri et al. 2000). Dies würde Nur77 aus dem Zellkern entfernen und damit den UCP1-Enhancer freigeben.

Dies würde die Expression von UCP1 wie beobachtet erst nach anderthalb bis zwei Stunden möglich machen, so dass kürzere Kälteexposition nicht zu einer Steigerung der Thermogenesekapazität durch erhöhten UCP1-Gehalt führt.

5 Zusammenfassung

Man unterscheidet bei Säugetieren zwei Typen von Fettgewebe, braunes (*brown adipose tissue, BAT*) und weißes Fettgewebe (*white adipose tissue, WAT*). Während das WAT der Speicherung von Energie in Form von Triglyceriden dient, wird im BAT Energie bei der durch UCP1 (*uncoupling protein 1*) vermittelten zitterfreien Wärmebildung (*NST = non shivering thermogenesis*) verbraucht.

Die Expression von UCP1 findet bei Säugetieren nur im BAT statt und wird dort β -adrenerg kontrolliert. In allen anderen Zelltypen wird die Expression von UCP1 unterdrückt. Einige Transkriptionsfaktoren, die an der UCP1-Genexpression beteiligt sind, wie z.B. PGC-1, RAR, TR, RXR α und PPAR γ sind bereits identifiziert worden (Lowell et al. 2000).

Obwohl braunes und weißes Fettgewebe diese sehr unterschiedlichen physiologische Funktionen ausüben, sind auf molekularer Ebene bislang nur wenige Gene und insbesondere Transkriptionsfaktoren beschrieben, deren Expression auf eines der beiden Fettgewebe beschränkt ist.

Da BAT-spezifische Gene hauptsächlich im Kontext der Aktivierung der Thermogenese zu erwarten sind, wurden die Transkriptome von β -adrenerg stimulierten und nicht-stimulierten braunen Adipozyten mit Hilfe der *representational difference analysis* verglichen.

Eines der dadurch erhaltenen β -adrenerg-kontrollierten Differenzprodukte war ein cDNA-Fragment des Transkriptionsfaktors Nur77. *In vivo*-Studien an Mäusen zeigten, dass Nur77 mRNA im BAT nach einem Kältestimulus schnell und transient induziert wird (Kanzleiter et al. in Vorbereitung). Im WAT ist Nur77 auch nach einem β -adrenergen Stimulus nicht nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktion der Waisenrezeptor Nur77 im braunen Fettgewebe ausübt. Zu diesem Zweck wurden zuerst die Induktionsbedingungen von Nur77 im BAT näher untersucht.

Beta-adrenerge Stimulation brauner Adipozyten führt über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese aktiviert Transkriptionsfaktoren wie CREB aber auch Enzyme wie die Hormon-sensitive Lipase, welche die Abspaltung freier Fettsäuren aus Triglyceriden katalysiert. Da

freie Fettsäuren in der Lage sind, durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Genregulation zu beeinflussen (Distel et al. 1992), wurde zunächst untersucht, ob Nur77 direkt durch PKA aktivierte Transkriptionsfaktoren oder über den Umweg der freien Fettsäuren induziert wird.

Braune Adipozyten wurden mit der Fettsäure Oleat stimuliert und die Nur77 Expression untersucht. Stimulation mit Oleat führte zu einer schwachen Induktion von Nur77, die jedoch deutlich unter der nach β -adrenerger Stimulation beobachteten Expression lag.

Demnach haben freie Fettsäuren wie Oleat zwar einen Einfluss auf die Nur77-Expression, die massive Induktion nach β -adrenerger Stimulation scheint aber direkt durch PKA aktivierte Transkriptionsfaktoren vermittelt zu werden.

Nur77 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an bestimmten DNA-Abschnitten die Genregulation direkt beeinflussen kann, aber auch in der Lage ist, durch Export aus dem Zellkern Effekte wie Apoptose auszulösen. Diese unterschiedlichen Wirkmechanismen von Nur77 werden durch posttranslationale Modifikation gesteuert.

Westernblot-Analysen in β -adrenerg stimulierten braunen Adipozyten zeigten eine deutliche Massenzunahme von Nur77, die auf posttranslationale Modifikation schließen lässt.

In Reporterstudien mit zwei bekannten durch Nur77 aktivierbaren *response elements* wurde überprüft, ob Nur77 diese in braunen Adipozyten aktivieren kann.

Die beobachtete Aktivierung der beiden *response elements* war zwar nur sehr schwach, konnte aber durch die Zugabe von Cyclosporin A, das die DNA-Bindung von Nur77 verhindert, blockiert werden. Da in einer früheren Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass Nur77 nach β -adrenerger Stimulation nicht aus dem Zellkern exportiert wird, kann dies als Hinweis auf eine direkt durch DNA-Bindung vermittelte Funktionsweise von Nur77 gesehen werden.

Allein aufgrund des Zeitverlaufes der Nur77- und UCP1-Expression nach β -adrenerger Stimulation bestand die Vermutung, dass Nur77 an der Regulation der UCP1-Expression beteiligt ist. Die UCP1-Expression setzt erst zu einem Zeitpunkt ein an dem die Nur77-Expression bereits wieder stark abgenommen hat. Zusätzlich

bestärkt wurde diese Vermutung durch Sequenzanalyse des UCP1-Enhancer, welche die Sequenz eines DNA-Bindemotives für Nur77 identifizierte.

Daher wurden Reportergenassays mit dem UCP1-Enhancer in HEK293-Zellen, die kein endogenes Nur77 enthalten, durchgeführt (Arbeiten von C. Eickhorst und F. Bolze).

Der bereits bekannte aktivierende Effekt von PPAR γ /RXR α -Heterodimeren auf den UCP1-Enhancer (Sears et al. 1996) konnte durch Kotransfektion mit Nur77 reprimiert werden. Diese durch Nur77 vermittelte Repression kann auf zwei Ursachen beruhen.

1. Nur77 ist in der Lage mit RXR α einen Heterodimer zu bilden und somit könnte es zu einer Konkurrenz zwischen Nur77 und PPAR γ um den Heterodimerpartner kommen.

2. Das durch Sequenzanalyse des UCP1-Enhancers identifizierte Nur77-Bindemotiv (NBRE) könnte bedeuten, dass die Repression der UCP1-Enhancer Aktivität durch direkte Bindung von Nur77 bewirkt wird.

Um zu überprüfen, ob Nur77 tatsächlich an den UCP1-Enhancer binden kann, wurden daher ChIP-Assays durchgeführt.

Dieses Experiment zeigte eine Bindung von Nur77 an den UCP1-Enhancer und bestärkt daher die Hypothese, dass es sich um eine Repression des UCP1-Enhancers durch direkte Interaktion mit Nur77 handelt.

Anschließend Versuche die UCP1-Expression in braunen Adipozyten durch Überexpression von Nur77 zu inhibieren scheiterten, da die gewählte Transfektionsmethode der Nucleofektion bereits selbst einen inhibierenden Einfluss auf die UCP1-Expression hatte.

Da vorausgegangene Versuche mit anderen Transfektionsmethoden wie Calcium-Phosphat, Liposomen basiert oder retrovirale Transfektion nur sehr unzureichende Effizienzen erbrachten, konnte mit diesem Versuchsansatz keine weitere Erkenntnis gewonnen werden.

Ein weiterer Hinweis für eine Repression der UCP1-Expression durch Nur77 wurde in dieser Arbeit durch Untersuchungen der Nur77-Expression während der Proliferation und Differenzierung von braunen Präadipozyten gewonnen. Beta-adrenerge Stimulation brauner Präadipozyten ist nicht in der Lage die UCP1-Expression zu aktivieren. In den frühen Phasen der Differenzierung (Proliferationsphase) konnte in braunen Adipozyten jedoch eine konstitutive

Expression von Nur77 beobachtet werden. Dies wäre eine Erklärung für die Inhibition der UCP1-Expression in braunen Präadipozyten, da andere an der UCP1-Expression beteiligte Faktoren wie PPAR γ und RXR α dort bereits exprimiert werden.

Als problematisch erwiesen sich Untersuchungen an Nur77-KO-Mäusen. In diesen Mäusen konnte weder in metabolischen Untersuchungen (Arbeit von I. Walter), noch bei anderen Wirkmechanismen, in denen eine essentielle Funktion von Nur77 bereits bestätigt ist (z.B. die Apoptose von T-Zellen), ein Phänotyp gefunden werden.

Die Waisenrezeptoren Nor1 und Nurr1, die zusammen mit Nur77 eine Unterfamilie der Kernrezeptoren bilden (Nr4a), sind in der Lage einen Ausfall von Nur77 zu kompensieren. Um zu untersuchen, ob diese Kompensation auch im braunen Fettgewebe die Ursache für die Abwesenheit eines Phänotypes ist, wurde die Expression von Nor1 und Nurr1 im BAT von Nur77-KO-Mäusen nach β -adrenerger Stimulation untersucht.

Beide Faktoren werden ebenso wie Nur77 nach β -adrenerger Stimulation im BAT induziert. Für Nor1 konnte eine Superinduktion bei homozygoten Nur77-KO-Mäusen gezeigt werden, die vermutlich die Ursache für einen fehlenden Phänotyp darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch überprüft, ob Nur77 einen Einfluss auf die Apoptoserate im BAT ausübt. In T-Zellen führt Nur77 zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und dadurch zu einer Aktivierung der Caspase 9. Daher wurde die Caspase 9-Aktivität in β -adrenerg stimulierten und Nur77 transfizierten braunen Adipozyten untersucht. Das Experiment zeigte nur eine minimale Veränderung der Caspase 9 Aktivität nach β -adrenerger Stimulation bzw. Nur77-Transfektion. Daher kann ausgeschlossen werden, dass Nur77 über eine Aktivierung der Caspase 9 die Apoptoserate in braunen Adipozyten beeinflusst.

Auf Erkenntnissen aus dieser Arbeit beruhend kann zusammenfassend gesagt werden, dass Nur77 vermutlich ein negativer Regulator der Thermogenesekapazität nach kurzzeitiger Kälteexposition ist.

Diese zunächst unlogisch klingende Hypothese, dass ein durch Kälte induzierter Faktor die Erhöhung der Thermogenesekapazität verhindert, ist bei näherer Betrachtung jedoch durchaus plausibel. Die Erhöhung der Thermogenesekapazität ist für einen Organismus mit erheblichen energetischen Kosten verbunden. Es wäre

daher durchaus sinnvoll bei einer kurzen Kälteexposition zwar die bereits vorhandene Thermogeneskapazität zu nutzen, aber nur bei länger andauernder Kälteexposition diese auch zu erhöhen. Die Expression von Nur77mRNA nach Kälteexposition ist sehr schnell zu messen, sie ist aber nur transient. Nach einer Stunde erreicht sie ihren höchsten Stand und nach etwa zwei Stunden ist sie bereits kaum noch detektierbar. Der Zeitpunkt, an dem Nur77 verschwindet, fällt in etwa mit dem Beginn der UCP1-Transkription zusammen. Eine länger als zwei Stunden andauernde Kälteexposition würde also zu einer gesteigerten UCP1-Expression führen und damit die Thermogeneskapazität erhöhen. Dieser Zeitrahmen ist in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten über die minimale Zeit der Kälteexposition, die zu einer Steigerung der Thermogeneskapazität führt.

6 Literatur

Altioek, S., Xu, M., and Spiegelman, B. M.; PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A; *Genes Dev.*; 1997 (15) 1987-1998

Boeuf, S., Klingenspor, M., Van Hal, N. L., Schneider, T., Keijer, J., and Klaus, S.; Differential gene expression in white and brown preadipocytes; *Physiol Genomics*; 2001 (1) 15-25

Calnan, B. J., Szychowski, S., Chan, F. K., Cado, D., and Winoto, A.; A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection; *Immunity.*; 1995 (3) 273-282

Cao, X., Liu, W., Lin, F., Li, H., Kolluri, S. K., Lin, B., Han, Y. H., Dawson, M. I., and Zhang, X. K.; Retinoid x receptor regulates Nur77/thyroid hormone receptor 3-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting; *Mol.Cell Biol*; 2004 (22) 9705-9725

Cheng, L. E., Chan, F. K., Cado, D., and Winoto, A.; Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis; *EMBO J*; 1997 (8) 1865-1875

Chomczynski, P.; One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA; *Anal.Biochem.*; 1992 (1) 134-139

Chomczynski, P. and Sacchi, N.; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; *Anal.Biochem.*; 1987 (1) 156-159

Crawford, P. A., Sadovsky, Y., Woodson, K., Lee, S. L., and Milbrandt, J.; Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice; *Mol.Cell Biol.*; 1995 (8) 4331-16

Distel, R. J., Robinson, G. S., and Spiegelman, B. M.; Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms; *J Biol Chem.*; 1992 (9) 5937-5941

Ethier, I., Beaudry, G., St Hilaire, M., Milbrandt, J., Rouillard, C., and Levesque, D.; The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression; *Neuropsychopharmacology*; 2004 (2) 335-346

Fahrner, T. J., Carroll, S. L., and Milbrandt, J.; The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally; *Mol.Cell Biol*; 1990 (12) 6454-6459

Geloën, A., Collet, A. J., Guay, G., and Bukowiecki, L. J.; Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation; *Am.J Physiol*; 1988 (1 Pt 1) C175-C182

- Ghorbani, M., Claus, T. H., and Himms-Hagen, J.; Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist; *Biochem.Pharmacol.*; 1997 (1) 121-131
- Green, H. and Meuth, M.; An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture; *Cell*; 1974 (2) 127-133
- Hazel, T. G., Misra, R., Davis, I. J., Greenberg, M. E., and Lau, L. F.; Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment; *Mol.Cell Biol*; 1991 (6) 3239-3246
- Heldmaier, G.; The Effect of Short Daily Cold Exposure on Development of Brown Adipose Tissue in Mice; *J Comp Physiol*; 1974
- Hirata, Y., Whalin, M., Ginty, D. D., Xing, J., Greenberg, M. E., Milbrandt, J., and Guroff, G.; Induction of a nerve growth factor-sensitive kinase that phosphorylates the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B; *J Neurochem.*; 1995 (4) 1780-1788
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M.; Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance; *Science*; 1993 (5091) 87-91
- Jimenez-Cervantes, C., Pichon, B., Dumont, J. E., and Maenhaut, C.; Activation by thyroid stimulating hormone of nerve growth factor-induced gene-B expression in thyrocytes in culture: relation with proliferation and specific gene expression; *Biochim.Biophys.Acta*; 1998 (3) 232-244
- Kanzleiter; Auswirkungen von NGF und β -adrenerger Stimulation auf die Expression und intrazelluläre Verteilung von Nur77 in braunen Adipozyten; 2001
- Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Ozato, K., and Guroff, G.; Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B; *Nat.Cell Biol*; 2000 (7) 435-440
- Kilduff, T. S., Vugrinic, C., Lee, S. L., Milbrandt, J. D., Mikkelsen, J. D., O'Hara, B. F., and Heller, H. C.; Characterization of the circadian system of NGFI-A and NGFI-A/NGFI-B deficient mice; *J.Biol.Rhythms*; 1998 (4) 347-357
- Klaus, S., Choy, L., Champigny, O., Cassard-Doulcier, A. M., Ross, S., Spiegelman, B., and Ricquier, D.; Characterization of the novel brown adipocyte cell line HIB 1B. Adrenergic pathways involved in regulation of uncoupling protein gene expression; *J Cell Sci.*; 1994 313-319
- Kozak, U. C. and Kozak, L. P.; Norepinephrine-dependent selection of brown adipocyte cell lines; *Endocrinology*; 1994 (2) 906-913
- Kuang, A. A., Cado, D., and Winoto, A.; Nur77 transcription activity correlates with its apoptotic function in vivo; *Eur.J Immunol.*; 1999 (11) 3722-3728
- Laemmli, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*; 1970 (259) 680-685

- Lee, S. L., Wesselschmidt, R. L., Linette, G. P., Kanagawa, O., Russell, J. H., and Milbrandt, J.; Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77); *Science*; 1995 (5223) 532-535
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C., and Zhang, X.; Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3; *Science*; 2000 (5482) 1159-1164
- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B. M.; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor; *J Biol Chem.*; 2002 (3) 1645-1648
- Lindquist, J. M. and Rehnmark, S.; Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival; *J Biol Chem.*; 1998 (46) 30147-30156
- Locke, R. M., Rial, E., Scott, I. D., and Nicholls, D. G.; Fatty acids as acute regulators of the proton conductance of hamster brown-fat mitochondria; *Eur.J Biochem.*; 1982 (2) 373-380
- Lowell, B. B. and Spiegelman, B. M.; Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis; *Nature*; 2000 (6778) 652-660
- Maruyama, K., Tsukada, T., Ohkura, N., Bando, S., Hosono, T., and Yamaguchi, K.; The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review); *Int.J Oncol.*; 1998 (6) 1237-1243
- Milbrandt, J.; Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene; *Neuron*; 1988 (3) 183-188
- Nechad, M., Ruka, E., and Thibault, J.; Production of nerve growth factor by brown fat in culture: relation with the in vivo developmental stage of the tissue; *Comp Biochem.Physiol Comp Physiol*; 1994 (2) 381-388
- Nedergaard, J., Herron, D., Jacobsson, A., Rehnmark, S., and Cannon, B.; Norepinephrine as a morphogen?: its unique interaction with brown adipose tissue; *Int.J Dev.Biol*; 1995 (5) 827-837
- Nisoli, E., Briscini, L., Giordano, A., Tonello, C., Wiesbrock, S. M., Uysal, K. T., Cinti, S., Carruba, M. O., and Hotamisligil, G. S.; Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 2000 (14) 8033-8038
- Nisoli, E., Tonello, C., Benarese, M., Liberini, P., and Carruba, M. O.; Expression of nerve growth factor in brown adipose tissue: implications for thermogenesis and obesity; *Endocrinology*; 1996 (2) 495-503
- Perlmann, T. and Jansson, L.; A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1; *Genes Dev.*; 1995 (7) 769-782

- Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M. H., Gauthier, Y., Hugo, P., and Drouin, J.; Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells; *Mol.Cell Biol*; 1997 (10) 5946-5951
- Pichon, B., Jimenez-Cervantes, C., Pirson, I., Maenhaut, C., and Christophe, D.; Induction of nerve growth factor-induced gene-B (NGFI-B) as an early event in the cyclic adenosine monophosphate response of dog thyrocytes in primary culture; *Endocrinology*; 1996 (11) 4691-4698
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B. M.; Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking; *Science*; 1999 (5443) 1368-1371
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B. M.; A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis; *Cell*; 1998 (6) 829-839
- Rabelo, R., Reyes, C., Schifman, A., and Silva, J. E.; A complex retinoic acid response element in the uncoupling protein gene defines a novel role for retinoids in thermogenesis; *Endocrinology*; 1996 (8) 3488-3496
- Raff, M.; Cell suicide for beginners; *Nature*; 1998 (6707) 119-122
- Ricquier, D., Casteilla, L., and Bouillaud, F.; Molecular studies of the uncoupling protein; *FASEB J*; 1991 (9) 2237-2242
- Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J. A., Soria, B., and Prentki, M.; Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1; *Diabetes*; 1999 (10) 2007-2014
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., and Spiegelman, B. M.; C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway; *Genes Dev.*; 2002 (1) 22-26
- Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M.; Molecular regulation of adipogenesis; *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*; 2000 145-171
- Ross, S. R., Choy, L., Graves, R. A., Fox, N., Solevjeva, V., Klaus, S., Ricquier, D., and Spiegelman, B. M.; Hibernoma formation in transgenic mice and isolation of a brown adipocyte cell line expressing the uncoupling protein gene; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 1992 (16) 7561-7565
- Sears, I. B., MacGinnitie, M. A., Kovacs, L. G., and Graves, R. A.; Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Mol.Cell Biol*; 1996 (7) 3410-3419
- Silva, J. E. and Rabelo, R.; Regulation of the uncoupling protein gene expression; *Eur.J Endocrinol.*; 1997 (3) 251-264
- Suzuki, S., Suzuki, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S. K., Ho, A., Bouchard, D., Mak, T. W., and Yeh, W. C.; Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 2003 (14) 8276-8280

Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D.; Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes; *J Biol Chem.*; 2003 (35) 33370-33376

Walter, I.; Einfluss des Waisenrezeptors Nur77 auf die zitterfreie Wärmebildung im braunen Fettgewebe: Metabolische Charakterisierung von Nur77 defizienten Mäusen; 2003

Wansa, K. D., Harris, J. M., and Muscat, G. E.; The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment; *J Biol Chem.*; 2002 (36) 33001-33011

Wiesinger, H., Klaus, S., Heldmaier, G., Champigny, O., and Ricquier, D.; Increased nonshivering thermogenesis, brown fat cytochrome-c oxidase activity, GDP binding, and uncoupling protein mRNA levels after short daily cold exposure of phodopus sungorus; *Can J Physiol Pharmacol*; 1990 195-200

Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M., and Milbrandt, J.; Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast; *Science*; 1991 (5010) 1296-1300

Winoto, A.; Molecular characterization of the Nur77 orphan steroid receptor in apoptosis; *Int.Arch.Allergy Immunol.*; 1994 (4) 344-346

Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V., and Winoto, A.; Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas; *Nature*; 1994 (6460) 277-281

Wu, Q., Liu, S., Ye, X. F., Huang, Z. W., and Su, W. J.; Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells; *Carcinogenesis*; 2002 (10) 1583-1592

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M.; Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1; *Cell*; 1999 (1) 115-124

Yang, W. L. and Lim, R. W.; Modulation of muscle creatine kinase promoter activity by the inducible orphan nuclear receptor TIS1; *Biochem.J*; 1997 281-287

Yazdanbakhsh, K., Choi, J. W., Li, Y., Lau, L. F., and Choi, Y.; Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 1995 (2) 437-441

Zetterstrom, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., and Perlmann, T.; Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1; *Mol.Endocrinol.*; 1996 (12) 1656-1666

Zhou, T., Cheng, J., Yang, P., Wang, Z., Liu, C., Su, X., Bluethmann, H., and Mountz, J. D.; Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells; *J Exp.Med.*; 1996 (4) 1879-1892

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei HD Dr. Martin Klingenspor bedanken für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können und die Unterstützung, die er mir jederzeit gewährte.

Tobias Fromme, Florian Bolze und Dr. Mauricio Berriel-Diaz danke ich für konstruktive Kritik und eifriges Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für Hilfe während der Arbeit sowie für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich mich bei Tatjana Schneider bedanken, die mich in den Anfängen meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

Schließlich möchte ich mich noch bei allen Personen und im besonderen Isabel bedanken, die mich motiviert und aufgeheitert haben, wenn was nicht so funktionierte wie es sollte.

Dem Graduiertenkolleg GRK767 danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und die Anregungen und Kritiken, die ich von anderen Mitgliedern des GRK erfahren habe. Besonderer Dank gilt Christine Weth, die mir bei der Etablierung der CHIP-Assays in unserem Labor geholfen hat.

GISSELBERGERSTRASSE 3 • 35037 MARBURG
TELEFON 06421/931638 • E-MAIL KANZLEITER@STAFF.UNI-MARBURG.DE

TIMO KANZLEITER

PERSÖNLICHE INFORMATION

1. Familienstand: ledig
2. Staatsangehörigkeit: deutsch
3. Alter: 29 (14.05.1975)
4. Geburtsort: Bad Soden im Taunus
5. Eltern: Dr. Teja Kanzleiter, Gudrun Kanzleiter

AUSBILDUNG

1981 - 1985	Friedrich-List Schule	Frankfurt am Main
1985 - 1991	Leibniz Gymnasium	Frankfurt am Main
1991 - 1994	Friedrich-Dessauer Gymnasium	Frankfurt am Main
1996	Praktikum bei Aventis/Agrevo	Frankfurt am Main
1996 - 1998	Johann-Wolfgang-Goethe Universität (Vordiplom, Biologie)	Frankfurt am Main
1998 - 2001	Philipps-Universität (Diplom, Biologie)	Marburg/Lahn
Nov, Dec 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Nationalen Genomforschungs-Netzwerk	Marburg/Lahn
2001 – 2004	Promotionsstipendium im GRK 767	Marburg/Lahn

ERSATZDIENST

1995 – 1996 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Funktionsanalyse des Waisenrezeptors Nur77 im braunen Fettgewebe

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)